PHOSPHODIESTERASE LANGERHANSSCHER INSELN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Martin Kallenberger
aus Ellwangen

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549627_0043

PHOSPHODIESTERASE LANGERHANSSCHER INSELN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Martin Kallenberger
aus Ellwangen

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 1980

Dekan: Prof. Dr. M. Hanack

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Mecke

meinen Eltern
und Erika
gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im November 1976 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Mai 1980 abgeschlossen.

Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Dr. A. du Moulin danke ich für einige Proben zweier Präparationen von Calmodulin und calmodulinabhängiger PDE, Herrn Professor Dr. J. Schultz für die Überlassung des Luminescence Biometers zu den Messungen.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon für ständige Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit herzlich bedanken.

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cAMP	cyclisches Adenosin-3':5'-monophosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Bis-(aminoethyl)-glycolether-N,N,N',N',-tetraessigsäure
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
IMP	Inosin-5'-monophosphat
IRI	immunoreaktives Insulin
$K_{m\,(app)}$	(scheinbare) Michaelis-Konstante
kPa	Kilopascal
KRB-Lösung	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
min	Minute
mM	millimolar
µM	mikromolar
µU	Mikroeinheiten
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
nM	nanomolar
n.s.	nicht signifikant
PDE	Phosphodiesterase, EC 3.1.4.17

pmol	Picomol
PPS	Pentosephosphatshunt
(S)	Substratkonzentration
SEM	Standard error of the mean =
	Mittlerer Fehler des Mittelwerts
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheiten (Insulin-, Enzym-Einheiten)
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.2	Fragestellung	8
2.	MATERIAL UND METHODIK	11
2.1	Versuchstiere	11
2.2	Geräte	11
2.2.1	Perifusionsapparatur	12
2.3	Chemikalien und Enzyme	13
2.4	Nähr- und Reagenzlösungen	15
2.4.1	Hanks' Lösung	15
2.4.2	KRB-Lösung	15
2.4.3	Reagenzlösungen zur PDE-Bestimmung	17
2.4.3.1	Puffer I	17
2.4.3.2	Reagenz II	18
2.4.3.3	Luciferase-Reagenz A	18
2.4.3.4	Luciferase-Reagenz B	19
2.4.3.5	AMP-Standards	21
2.4.3.6	ATP-Standards	21
2.4.3.7	Aktivatorabhängige PDE und Calmodulin aus Meerschweinchenhirn	22
2.4.4	Reagenzlösungen zur DNA-Bestimmung	26
2.4.4.1	Diaminobenzoesäure-Reagenz	26
2.4.4.2	DNA-Standards	26

2.5	Isolierung der Langerhansschen Inseln	27
2.6	Vorinkubation der Inseln	29
2.7	Perifusion	29
2.7.1	Aufbau der Perifusionsapparatur	29
2.7.2	Durchführung der Perifusionen	34
2.7.3	Perifusionsstop und Bereitung der Inselhomogenate zur PDE - Bestimmung	35
2.7.3.1	Versuche zur Bereitung des Inselhomogenats	37
2.8	Bestimmung der PDE-Aktivität Langerhansscher Inseln	38
2.8.1	Verschiedene Methoden zur PDE-Bestimmung	38
2.8.1.1	Methode nach Butcher und Sutherland	39
2.8.1.2	Methode nach Thompson und Appleman, bzw. Variation nach Loten und Sneyd	39
2.8.1.3	Methode nach Drummond und Perrot-Yee, bzw. Variation nach Dedman und Means	40
2.8.1.4	Methode nach Pöch	40
2.8.1.5	Methode nach Han et al.	41
2.8.1.6	Methode nach Johnson et al. (Luciferase-Methode)	41
2.8.2	Beschreibung der verwendeten Methode	43
2.8.2.1	Durchführung	43
2.8.2.2	Ausrechnung der PDE-Bestimmung entsprechend der Wiederfindung von AMP-Verdünnungsreihen	44
2.8.2.3	Schema: Endkonzentrationen im Bestimmungsansatz	46
2.9	DNA - Bestimmung	47
2.9.1	Durchführung der DNA - Bestimmung	47
2.10	Insulinbestimmung	48

3.	ERGEBNISSE - METHODISCHER TEIL	50
3.1	Entwicklung und Erprobung der Perifusions-apparatur	50
3.1.1	Umschaltung der Perifusionsmedien	50
3.1.2	Druckverhältnisse in den Perifusionskammern	53
3.2	Ergebnisse der Untersuchungen zur Ausarbeitung der PDE - Bestimmung in kleinsten Gewebemengen (ca. 5 isolierte Langerhanssche Inseln)	55
3.2.1	ATP-Messung mit Luciferase-Reagenz A	55
3.2.1.1	Benötigte Menge an gefriergetrockneter Luciferase	55
3.2.1.2	Zusätze zum Luciferase-Reagenz A	56
3.2.1.3	Hemmung der Luciferase durch Chlorid- und Ammonium-Ionen	57
3.2.2	ATP-Messung mit Luciferase-Reagenz B	60
3.2.2.1	Benötigte Menge an Luciferase bzw. Luciferin	60
3.2.2.2	Stabilitätserhöhung des Luciferase-Reagenz B	61
3.2.3	Versuche zur Inkubation II	61
3.2.4	Versuche zur AMP-Wiederfindung in Gegenwart von Inselhomogenat	64
3.2.5	Versuche zur PDE-Bestimmung in Inselhomogenat	68
3.2.5.1	Lineare Abhängigkeit von der Gewebemenge	68
3.2.5.2	Zeitlinearität	69
3.3	Ergebnisse der Untersuchungen zur DNA-Bestimmung in Langerhansschen Inseln	70
3.3.1	Vergleich mit der Methode nach Beckmann	70
3.3.2	DNA-Wiederfindung in Gegenwart von Inselhomogenat	70

3.3.3 Prüfung auf Einflüsse der Perifusionszusätze 71

3.3.4 Kritik der Bestimmungsmethode 73

4. VERSUCHSERGEBNISSE 74

4.1 Versuche mit nicht perifundierten Inseln 74

4.1.1 PDE-Formen in Langerhansschen Inseln 74

4.1.1.1 Michaelis-Konstanten, Maximalgeschwindigkeiten 74

4.1.1.2 $K_{m\,app}$ und V_{max} in Gegenwart von EGTA 76

4.1.2 Versuche zum Nachweis von Calmodulin im Homogenat Langerhansscher Inseln 77

4.1.2.1 Einfluß von Inselextrakt auf calmodulinabhängige Phosphodiesterase 77

4.1.2.1.1 Einfluß von Trifluoperazin 79

4.1.3 Versuche zum Nachweis von Calmodulin·Ca^{++}-abhängiger PDE in Langerhansschen Inseln 80

4.1.3.1 Einfluß von Calmodulin auf die PDE-Aktivität im Homogenat Langerhansscher Inseln 80

4.1.3.2 Einfluß von Trifluoperazin 80

4.1.3.3 Einfluß von EGTA 82

4.2 Perifusionsversuche 84

4.2.1 Glucose-induzierte Insulinsekretion 84

4.2.2 PDE-Aktivität nach Perifusion mit Glucose 86

4.2.3 PDE-Aktivität nach Perifusion mit Glucose + Insulin 90

4.2.4 PDE-Aktivität nach Perifusion mit Glucose + Diamid 93

5. DISKUSSION 97

5.1 PDE-Formen und Calmodulin in Langerhansschen Inseln 97

5.1.1	High-K_m und low-K_m PDE	97
5.1.2	Calmodulin	98
5.1.3	Calmodulin • Ca^{++} - abhängige PDE	99
5.2	Glucose und PDE-Aktivität	100
5.3	Exogenes Insulin und PDE-Aktivität	102
5.4	Diamid und PDE-Aktivität	104
6.	ZUSAMMENFASSUNG	106
6.1	Versuchsergebnisse	108
6.2	Schlußfolgerungen	110
7.	LITERATURVERZEICHNIS	111

1. EINLEITUNG

1.1 Stand der Forschung

Eine cAMP-Phosphodiesterase, gefunden in Rinderherz, wurde 1958 von Sutherland und Rall beschrieben (70) als dasjenige Enzym, das den Abbau des zwei Jahre zuvor entdeckten cAMP zu AMP katalysiert und damit, wie man heute weiß, seine Wirksamkeit als "second messenger" beendet.

1971 zeigten Thompson und Appleman (72) die Existenz verschiedener Phosphodiesterase (PDE)-Formen in Rattenhirn. Seitdem wurden in Extrakten aus Säugetiergeweben mindestens 4 Iso-Enzyme der cyclische Nucleotide spaltenden Phosphodiesterasen (EC 3.1.4.17) identifiziert. Allerdings können Anzahl und Eigenschaften der erhaltenen Enzymformen durch Isolierungstechniken verändert erscheinen (76). Ob die verschiedenen PDE-Formen in intakten Zellen dieselben Eigenschaften besitzen wie im zellfreien System, ob eine einzige oder welche der verschiedenen PDE-Formen jeweils die wichtigste Rolle bei der Regulation der intrazellulären Spiegel von cAMP und cGMP spielen, ist nicht geklärt.

Eine PDE-Hauptform entspricht wohl dem ursprünglich von Butcher und Sutherland (20) in Rinderherz untersuchten

Enzym. Diese PDE - Form (aus dem Engl. übernommen meist kurz "high-K_m PDE" genannt) katalysiert die Hydrolyse von cGMP wie von cAMP. Michaelis-Konstanten für den Abbau von cAMP werden angegeben von ca. 30 - 180 μM (18, 35, 51, 62, 67, 72); niedriger sind die K_m - Werte für die Hydrolyse von cGMP (18, 82).
Die Aktivität der high-K_m PDE kann in Anwesenheit von Ca^{++} - Ionen stimuliert werden durch ein Aktivatorprotein, das 1970 unabhängig von Cheung (23) und von Kakiuchi et al. (38) beschrieben wurde und kürzlich von Cheung die Bezeichnung Calmodulin erhielt.

Calmodulin ist ein hitzestabiles Protein; diese Eigenschaft benutzt eine einfache Methode zur Präparation calmodulinhaltiger Gewebsextrakte, bei der die mitenthaltenen Enzyme durch mehrminütiges Erhitzen im siedenden Wasserbad inaktiviert werden. Das Molekulargewicht - ca. 16 700 - und die Aminosäuresequenz sind bekannt (s. 24).
Die Ca^{++} - abhängige Aktivierung der high-K_m PDE verläuft, schnell und reversibel, in zwei Schritten (25):

(I) Calmodulin + $Ca^{++} \rightleftharpoons$ Calmodulin$^{*} \cdot Ca^{++}$

(II) Calmodulin$^{*} \cdot Ca^{++}$ + PDE $\rightleftharpoons$ Calmodulin$^{*} \cdot Ca^{++} \cdot$ PDE*

(dabei bezeichnet der Index * jeweils die aktivierte Form)

Calmodulin wurde in vielen Säugetierzellarten gefunden und, nachdem es ursprünglich als PDE - Aktivator entdeckt worden war, sind inzwischen eine Vielzahl von calmodulin-

abhängigen Enzymen und Funktionen bekannt, wie z.B.: Adenylat Cyclase, high-K_m Phosphodiesterase, Phospholipase A_2, Phosphorylase Kinase, Ca^{++}-abhängige Proteinkinase, Ca^{++}-ATPase, Neurotransmitterfreisetzung, Membranphosphorylierung, u.a. (Übersicht bei 24).

Da die zur halbmaximalen Enzymaktivierung benötigte Ca^{++}-Konzentration mit 1-5 μM in demselben Bereich liegt, der für physiologische Ca^{++}-Spiegel im Cytosol angenommen wird (48), wird Calmodulin in neuester Zeit außer der Aktivierung der high-K_m PDE eine allgemein wichtige, wenn nicht sogar die Kardinalrolle bei der Vermittlung von Einflüssen der intrazellulären Ca^{++}-Konzentration auf zelluläre Vorgänge zugeschrieben (24).

Eine neue Form einer Ca^{++}-abhängigen PDE wurde kürzlich in Lungengewebe gefunden: diese Form enthält Calmodulin als fest gebundene, nicht abdissoziierende Untereinheit und benötigt daher zur vollen Aktivität Ca^{++}-Ionen, aber kein zusätzliches Calmodulin (64).
In Leberhomogenat wurde eine andere PDE-Form nachgewiesen, die sowohl cAMP als auch cGMP als Substrat annimmt. Sie zeichnet sich dadurch aus, daß die cAMP-Hydrolyse durch Anwesenheit von cGMP (in micromolaren Konzentrationen) allosterisch stimuliert wird, jedoch nicht umgekehrt die cGMP-Hydrolyse durch cAMP (9).

Eine weitere Hauptform der PDE, im folgenden als "low-K_m PDE" bezeichnet, besitzt eine hohe Substratspezifität für cAMP. Da ihre Michaelis-Konstante in derselben Größenordnung von 1 μM liegt (18, 44, 51, 53, 62, 67) wie die intrazelluläre cAMP - Konzentration (86), könnte die low-K_m PDE möglicherweise für die Regulation intrazellulärer cAMP - Spiegel von größerer Bedeutung sein als die high-K_m Form (8, 14).

Die Aktivität der low-K_m PDE ist nicht abhängig von Ca^{++} - Ionen oder Calmodulin; jedoch kann sie durch verschiedene Hormone stimuliert werden:

Bei Einwirkung auf intakte Zellen stimulieren Glucagon, Adrenalin, Isoprenalin und Adrenocorticotropes Hormon die low-K_m PDE in Fett- und Leberzellen (51, 58, 67). Pawlson und Mitarb. nehmen an, daß hierbei der durch die lipolytischen Hormone erhöhte cAMP-Spiegel die Aktivität der low-K_m PDE steigern kann, da die beobachtete Aktivitätssteigerung etwa demselben Zeitverlauf folgt wie der intrazelluläre cAMP-Anstieg, auch entsprechend schnell wie letzterer wieder auf den Ausgangswert zurückgeht, und da die adrenalininduzierte low-K_m PDE-Stimulierung durch Propranolol blockiert werden kann.

Auch Insulin stimuliert die Aktivität der low-K_m PDE in Fett- und Leberzellen; ebenfalls nur bei Einwirkung auf intakte Zellen, nicht im zellfreien System (44, 51, 53, 58, 59, 67). Der Mechanismus dieser Insulinwirkung ist unbekannt, er scheint jedoch verschieden zu sein von der

Wirkungsweise der lipolytischen Hormone (58); eine Neusynthese des Enzyms hat dabei keine Bedeutung (44). Die Stimulierung der low-K_m PDE ist bereits nach wenigen Secunden Insulineinwirkung meßbar (44, 51) und bleibt über längere Zeit konstant (30 / 40 min z.B. bei 58, 51).

Eine wichtige Rolle für die Aktivität der low-K_m PDE spielen SH- und S-S-Gruppen. Sowohl die unstimulierte wie die durch Insulin erhöhte Aktivität der low-K_m PDE in Fettzellen wird durch die S-S- reduzierende Substanz Dithiothreit vermindert, andererseits durch Oxidation in Gegenwart von z.B. Diamid oder $Na_2S_4O_6$ aufrechterhalten und stabilisiert (43 bzw. 44).
Kono und Mitarb. (44) nehmen an, daß auch oxidiertes Glutathion (GSSG) bei der "oxidativen Stabilisierung" der Aktivität der low-K_m PDE eine Rolle spielen kann. Im Einklang damit steht die Vermutung von Phelps und Varandani (59), daß das Enzym Glutathion-Insulin-Transhydrogenase (GIT) an der Insulinwirkung auf die low-K_m PDE in Fettgewebe beteiligt ist, da ein Zusatz von GIT-Antiserum im Inkubationsmedium die PDE-Stimulierung blockiert.
Loten et al. (51) allerdings fanden keine Verringerung der insulinstimulierten low-K_m PDE-Aktivität bei Zusatz der S-S- reduzierenden Substanz 2-Mercaptoäthanol.

In Langerhansschen Inseln wurden ebenfalls zwei verschiedene PDE-Formen mit hoher und niederer Affinität für cAMP

gefunden: die angegebenen Michaelis-Konstanten betragen 3 - 10 µM bzw. 30 - 500 µM (8, 17, 63). Ob die Phosphodiesterasen der Inselzellen gleichen Regulationsmechanismen unterliegen wie die low-K_m PDE in Fett- und Leberzellen (z.B. Insulin-Stimulierung) oder die high-K_m PDE (Calmodulin·Ca^{++} - Aktivierung), ist nicht bekannt. Das Vorkommen von Calmodulin in Langerhansschen Inseln wurde kürzlich nachgewiesen (65, 69, 74).

Bei der Regulation der Insulinsekretion Langerhansscher Inseln ist das cAMP - System von Bedeutung; dabei wird eine mehr modulierende als auslösende Funktion des cAMP angenommen (22, 55). Glucose, der wichtigste physiologische Stimulus der Insulinsekretion, erhöht in vitro den intrazellulären cAMP - Spiegel Langerhansscher Inseln (Übersicht z.B.: 21) wie auch die intrazelluläre Ca^{++} - Konzentration (54). Über den Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion herrscht allerdings noch keine Klarheit; auch ist nicht geklärt, in wieweit dem Glucosemetabolismus in den Inselzellen - möglicherweise in Beziehung zum cAMP-System - eine bestimmende Rolle zukommt. Neuere Befunde lassen darauf schließen, daß der Glucoseabbau über den Pentose-Phosphat-Shunt (PPS) von wichtiger Bedeutung für die Regulation der Insulinsekretion ist:
So wurde gezeigt, daß die Aktivität des PPS (bestimmt durch Messung des $^{14}C_1$ - Glucose / $^{14}C_6$ - Glucose - Oxidation-

Quotienten) in Langerhansschen Inseln bei Inkubation mit steigenden Glucosekonzentrationen zunimmt (80), andererseits werden PPS wie glucoseinduzierte Insulinsekretion durch exogenes Insulin gehemmt (6).

NADPH, welches als reduzierter Teil des Redoxpaares NADPH / NADP vorwiegend über den PPS gebildet wird, steht in Verbindung mit dem wichtigen intrazellulären Redoxsystem GSH / GSSG.

Auf eine Beziehung zwischen der Regulation der Insulinsekretion, dem cAMP-System der Inselzellen und den NADPH / NADP- und GSH / GSSG- Redoxsystemen lassen folgende Befunde schließen:

- Glucose führt konzentrationsabhängig in Langerhansschen Inseln zu einem Ansteigen des NADPH / NADP-Quotienten (81), des GSH / GSSG-Quotienten (2, 30), und des intrazellulären cAMP-Spiegels (4, 34).
- Exogen zugesetztes Insulin vermindert den NADPH / NADP-Quotienten (6), den GSH-Gehalt (2) und hemmt die durch Glucose (6) und andere Stimulantien (7, 78) induzierte Insulinsekretion.
- Diamid (0,1 mM), eine SH-Gruppen oxidierende Substanz, verringert durch Oxidation von GSH (45) den GSH / GSSG-Quotienten (30), hemmt die durch Glucose (1) und andere Stimulantien (3, 56) induzierte Insulinsekretion und verringert den intrazellulären cAMP-Anstieg in Gegenwart von 3 mg Glucose / ml; allerdings nicht den intrazellulären cAMP-Spiegel bei Anwesenheit von 1 mg Glucose / ml mit oder ohne Zusatz von Theophyllin (34).

1.2 Fragestellung

1. Ein erster Teil der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine entsprechend empfindliche Methode zur Bestimmung der cAMP - PDE - Aktivität im Homogenat einer möglichst geringen Anzahl von Langerhansschen Inseln auszuarbeiten. Damit sollten zunächst die kinetischen Konstanten (K_m , V_{max}) der PDE-Formen in Inselhomogenat bestimmt werden, um die Meßmethode durch Vergleich mit den Werten anderer Autoren zu überprüfen; und, um geeignete cAMP-Konzentretionen zur Messung der PDE - Aktivitäten festzulegen (Im Bereich der Michaelis-Konstante, bzw. der cAMP-Konzentration für Maximalgeschwindigkeit der low-K_m PDE, um etwaige Veränderungen sowohl von K_m wie V_{max} feststellen zu können. Bei der höheren cAMP-Konzentration wird gleichzeitig die Aktivität der high-K_m PDE miterfaßt).

2. Weiter sollte untersucht werden, ob Calmodulin beziehungsweise eine Calmodulinabhängigkeit der high-K_m PDE wie in vielen anderen Geweben auch in Inseln nachweisbar ist.
In zweiten Teil der Arbeit sollten Einflüsse auf die PDE isolierter Inseln untersucht werden.

3. Dazu war eine Perifusionsanordnung für isolierte Langerhanssche Inseln aufzubauen, um Rückwirkungen durch das aus den untersuchten Inseln selbst sezernierte Insulin zu vermeiden. Zur Überprüfung der Funktion der Perifusions-

apparatur und zur Feststellung des zeitlichen Verlaufs sollte die biphasiche Insulinsekretionskurve perifundierter Inseln bei Stimulation mit Glucose bestimmt werden.

Entsprechend den Stadien der biphasischen Insulinsekretion sollte die Aktivität der cAMP - PDE Langerhansscher Inseln jeweils nach verschiedenen Perifusionszeiten gemessen werden.

4. Bei Versuchen an isolierten Fettzellen war beobachtet worden, daß die Aktivität der low-K_m PDE durch Änderungen des Redoxzustandes von S-S- bzw. SH-Gruppen beeinflußt wird (43, 44). Da andererseits bei Langerhansschen Inseln die Stimulierung der Insulinsekretion durch Glucose mit einer Veränderung des intrazellulären Redoxzustandes einhergeht (2, 81), sollte untersucht werden, ob in Inseln die Aktivität der PDE - als Teil des cAMP-Systems, dem eine modulierende Funktion bei der Regulation der Insulinsekretion zugeschrieben wird (22, 55) - bei Glucosestimulation verändert wird.

5. Ausgehend von den Befunden, daß Insulin zum einen in Fett- und Leberzellen die Aktivität der low-K_m PDE erhöht, zum anderen in Langerhansschen Inseln exogenes Insulin die durch Glucose und andere Stimulantien hervorgerufene Insulinsekretion hemmt (6, 7, 78), stellte sich die Frage, ob möglicherweise auch in Inseln die low-K_m PDE-Aktivität durch exogenes Insulin beeinflußt wird.

6. Der intrazelluläre Redoxzustand Langerhansscher Inseln kann auch direkt durch Diamid verändert werden, eine Substanz, die zur Erniedrigung des GSH/GSSG-Quotienten in Inseln führt (30) und dabei die Insulinsekretion verringert (1, 3, 56). Daher sollte weiter untersucht werden, ob die Aktivität der PDE in Inseln bei Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion durch Diamid verändert wird.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts von 200 - 350 g Körpergewicht verwendet. Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen bei einer Raumtemperatur zwischen 24° und 26° C und bei einer relativen Luftfeuchte von 55 - 65 % im 12-Stunden Tag / Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage / Lippe und Trinkwasser ad libitum.

2.2 Geräte

Automat. Gamma-Zähler	Nuclear Chicago Corp., USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße Nr. 3810	Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz, Hamburg
Fluorimeter FP 100	Baird-Atomic, Bedford, Mass., USA
Gefriertrocknungsanlage Beta	Christ, Osterode
Luminescence Biometer 760	DuPont Instr., Bad Nauheim
pH - Meter H5	Beckman Instruments, München
Schüttel - Wasserbad	Köttermann, Häningsen, Han.

Stereo - Mikroskop SM 6	Nikon, Japan
Ultraschall - Homogenisator Labsonic 1510	Braun, Melsungen
Vortex-Genie Whirlmix	Wilten & Co., Etten-Leur, Niederlande
Zentrifuge UJ II KS	Heräus-Christ, Osterode
Zentrifuge 5413	Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz, Hamburg

2.2.1 Perifusionsapparatur

Perifusionskammern:	
Filtervorsatz SX 0001300	Millipore, Neu-Isenburg
Nylongeflecht für Filterplättchen:	
Nytal ASTM 400 - 37 u	G. Maierthaler KG, Köln - 30
Schlauchpumpe Minipuls II	Abimed, Düsseldorf
mit: Pumpenförderschläuchen DT - 76	"
Pumpenschlauchadapter 825.040	"
Umschaltventil 002001	Labotron, Gelting / München
Fraktionssammler Minirac 17000	LKB, Bromma, Schweden
Photometer PM 6	Zeiss, Oberkochen
Micron MP 15 Druckaufnehmer	HSE Elektronik, Hugstetten
HSE - Elektromanometer	" (/Freiburg)
EKA - Puls	"

2.3 Chemikalien und Enzyme

Adenosin	Boehringer Mannheim
Adenosin-5'-diphosphat (Na_2-)	"
Adenosin-5'-monophosphorsäure	"
Adenosin-5'-triphosphat (Na_2-)	"
Adenosin-3':5'-monophosphorsäure	"
Carbogen (95 % O_2 : 5 % CO_2)	Mast, Tübingen
Collagenase Typ CLS (EC 3.4.24.3)	Worthington Biochem. Co., Freehol, N.J., USA
3,5-Diaminobenzoesäure (· 2 HCl)	Fluka, Buchs, Schweiz
DNA aus Kälberthymus	Serva, Heidelberg
Fructose-1,6-diphosphat	Boehringer Mannheim
α-D-Glucose	Serva Heidelberg
Glucose-6-phosphat	Boehringer Mannheim
Guanosin-5'-monophosphorsäure	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA
Inosin-5'-monophosphat (Na_2-)	Boehringer Mannheim
Luciferase (Extrakt aus Leuchtorganen von Photinus pyralis)	"
Luciferase (Reinenzym) (EC 2.7.-.-.)	"
Luciferin	"
Myokinase aus Kaninchenmuskel (EC 2.7.4.3)	"
Phosphodiesterase aus Rinderherz (EC 3.1.4.17)	"
Phosphoenolpyruvat (Tricyclohexyl-ammonium-Salz)	"

Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskel (EC 2.7.1.40)	Boehringer Mannheim
Rinderserumalbumin	Behringwerke, Marburg
Ratten-Insulin	Novo Lab., Copenhagen
Insulin-Radioimmunoassay Kit (Insik - I)	CIS-SORIN, Italien (geliefert durch Isotopendienst West, Sprendlingen)

Diamid wurde synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Fa. HAG AG, Bremen

Trifluoperazin (Dihydrochlorid) wurde von Fa. Röhm Pharma, Darmstadt, zur Verfügung gestellt.

Calmodulin und calmodulinabhängige Phosphodiesterase, präpariert aus Meerschweinchenhirn (29, p.71), waren ein freundl. Geschenk von Dr. A. du Moulin, Tübingen.

Alle nicht genannten Chemikalien und Biochemika stammten von Fa. Merck, Darmstadt.

2.4 Nähr- und Reagenzlösungen

2.4.1 Hanks' Lösung (33)

Stammlösung:	NaCl	80.00 g
	KCl	4,00 g
	$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,60 g
	KH_2PO_4	0,60 g
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,00 g
	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	1,85 g
	Aqua bidest. ad	1000 ml

Vor Gebrauch wurde diese Stammlösung mit bidestilliertem Wasser 1 + 9 verdünnt, Glucose wurde zu 4,4 mM (= 0,8 mg / ml) gelöst und der pH - Wert mit $NaHCO_3$ - Lösung auf 7,35 eingestellt.

2.4.2 Krebs - Ringer - Bicarbonat (KRB) - Lösung

Die verwendete KRB - Lösung setzte sich nach der Originalbeschreibung von Umbreit et al. (73) folgendermaßen zusammen:

NaCl - Lösung	0,90 %	= 154 mM	100 Teile
KCl - Lösung	1,15 %	= 154 mM	4 Teile
$CaCl_2$ - Lösung	1,22 %	= 110 mM	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung	2,11 %	= 154 mM	1 Teil
$MgSO_4$ - Lösung	3,82 %	= 154 mM	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung	1,30 %	= 154 mM	21 Teile

Um diese Lösung jederzeit frisch herstellen zu können, erwies es sich als praktisch, drei voneinander getrennte Stammlösungen folgender Zusammensetzung zu bereiten:

Lösung A:	NaCl	69,20 g
	KCl	3,61 g
	KH_2PO_4	1,62 g
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,93 g
	gelöst in 1 l Aqua bidest.	
Lösung B:	$NaHCO_3$	21,10 g
	gelöst in 1 l Aqua bidest.	
Lösung C:	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	3,73 g
	gelöst in 1 l Aqua bidest.	

Vor Gebrauch wurden die Stammlösungen in folgenden Mengen miteinander gemischt:

Lösung A:	1 Teil
Lösung B:	1 Teil
Lösung C:	1 Teil
Aqua bidest.	7 Teile

Diese KRB-Lösung wurde 30 min mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) begast. Dann wurde o,5 % Rinderserumalbumin gelöst und der pH-Wert auf 7,35 eingestellt. Diese Lösung diente als Perifusionsmedium; es mußten nur noch die für die jeweiligen Versuche benötigten Substanzen zugesetzt werden.
Zur Verwendung als Inkubationsmedium für isolierte Inseln

(in einigen Vorversuchen) wurde 2% anstatt o,5% Rinderserumalbumin gelöst.

2.4.3 Reagenzlösungen zur PDE-Bestimmung

2.4.3.1 Puffer I

Zusammensetzung:		Endkonzentration:
Glycylglycin	330 mg	50 mM
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	25 mg	2 mM
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	1,5 mg	o,2 mM
Rinderserumalbumin	15 mg	o,3 mg/ml
Aqua bidest. ad	50 ml	

Mit 1 N KOH wurde pH 8,o eingestellt.
Für eine Reihe von Vorversuchen war die verwendete Menge an $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$: 125 mg/50 ml entsprechend 10 mM.

In Anteilen dieses Puffers I wurden die je nach Versuch benötigten Reagenzzusätze gelöst, unter anderen 1 mM GMP und verschiedene Konzentrationen cAMP. Dazu dienten tiefgefroren bei - 20° C aufbewahrte cAMP-Proben: cAMP (als freie Säure) wurde in Puffer I, aus dessen Zusammensetzung $CaCl_2$ weggelassen war, gelöst und zu 100 µM genau verdünnt; 2 ml-Proben wurden eingefroren.

2.4.3.2 Reagenz II

Zusammensetzung: Dithiothreit 3 mg

Phosphoenolpyruvat 5 mg
(Tricyclohexylammonium-Salz)

wurden in 8,6 ml Puffer I gelöst. Zu o,86 ml dieser Lösung wurden zugesetzt:

Myokinase	50 µl	(36 U)
Pyruvatkinase	50 µl	(20 U)
ATP - Standard	40 µl	(80 pmol)

Reagenz II wurde jeweils frisch hergestellt.

2.4.3.3 Luciferase - Reagenz A

Für das jeweils frisch herzustellende Luciferase-Reagenz A dienten tiefgefroren (- 20° C) aufbewahrte 8 ml - Portionen des MPS - Puffers folgender Zusammensetzung:

3-Morpholinopropansulfonsäure (MPS)	2,09 g	(= 10 mM)
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,46 g	(= 10 mM)
frisch bidestilliertes Wasser	ad 1000 ml	

Mit 1 N KOH wurde pH 7,4 eingestellt.

Zum Gebrauch wurden Luciferase[x] 1 mg/ml

Rinderserumalbumin 5 mg/ml

in frisch aufgetautem MPS - Puffer gelöst. Nach 20 min Stehenlassen bei 20° C wurde 5 min bei 1500 UpM zentri-

fugiert (Zentrifuge UJ II KS), und jeweils 100 ul der klaren Lösung wurden in spezielle Küvetten pipettiert. Bis zur Verwendung wurde das Luciferase-Reagenz A 3 - 6 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen.

x Während vorliegende Arbeit angefertigt wurde, stellte die Lieferfirma die Herstellung des oben angeführten Luciferasepräparates (ein teilweise gereinigtes Präparat aus Leuchtkäferorganen von Photinus pyralis, enthaltend das Enzym Luciferase - ohne Angabe der Enzymaktivität - sowie das Substrat Luciferin) ein. Anstelle dessen wurde eine hochgereinigte Luciferase und kristallisiertes Luciferin lieferbar.
Luciferase-Reagenz A wurde bei Vorversuchen sowie bei der ersten Serie Perifusionsversuche der vorliegenden Arbeit verwendet. Für die weiteren Versuche wurde ein Luciferase-Reagenz B aus den neuen Enzympräparationen benutzt. Da alle Meßwerte auf jeweils parallel gleichbehandelte Standardreihen bezogen wurden, hatte die Umstellung auf die Ergebnisse keinen Einfluß.

2.4.3.4 Luciferase - Reagenz B

1 mg Luciferase (Reinenzym) wurde in 4 ml eiskaltem Tris-Acetat - Puffer (o,5 M, pH 7,5) unter vorsichtigem Schwenken gelöst und in geeigneten Portionen in braunen Enzymgläschen tiefgefroren (- 20°) bis zu einigen Wochen auf-

bewahrt. (Haltbarkeit mehrere Monate)

Luciferin wurde (o,5 mg auf 2,5 ml) in eiskaltem Tris-Acetat-Puffer (100 mM, pH 7,5) in einem braunen Enzymgläschen gelöst und bei 4° C bis zu 10 Tage aufbewahrt.

Ein Luciferase-Puffer wurde wie folgt hergestellt:

Tris	1,80 g	(= 50 mM)
Na_2 - EDTA	o,17 g	(= 1,5 mM)
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	o,75 g	(= 10 mM)
Aqua bidest. ad 300 ml.		

Mit konzentrierter Essigsäure wurde pH 7,75 eingestellt. 8 ml-Proben wurden eingefroren (- 20° C) aufbewahrt.

Zum Gebrauch wurde das Luciferase-Reagenz B wie folgt zusammengesetzt:

Luciferase-Vorratslösung	100 µl
Luciferin - Vorratslösung	500 µl
Rinderserumalbumin	4 mg
Dithiothreit	1,5 mg
Luciferase-Puffer ad	5 ml

Vom fertigen Luciferase-Reagenz B wurden je 100 µl in Glasküvetten zur ATP-Messung pipettiert und innerhalb 3 Stunden verbraucht.

2.4.3.5 AMP - Standards

Adenosinmonophosphorsäure wurde in 50 mM Glycylglycin-puffer pH 8,o , enthaltend 10 mM $MgSO_4$, gelöst und auf 10 μM genau verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 1 ml - Proben als AMP - Standards tiefgefroren (- 20° C) aufbewahrt. Zur Auswertung der PDE - Bestimmung wurden jeweils frisch hergestellte Verdünnungsreihen dieser AMP - Standards (entsprechend 200 - 100 - 50 - 25 pmol im Bestimmungsansatz) als Eichgerade benutzt.
Die Haltbarkeit wurde an 15 Monate lang bei - 20° C aufbewahrten AMP - Standards geprüft. Eine Abnahme gegenüber frisch hergestellten AMP - Standards war nicht meßbar (bei 2 Verdünnungsstufen gemessen alt / neu: 102,6% und 96,8% ; Mittelwert 99,7%).

2.4.3.6 ATP - Standards

Alle verwendeten Gefäße wurden mit konzentrierter Salpetersäure ausgekocht und mit bidestilliertem Wasser gespült; der für ATP - Standards verwendete Puffer wurde mit frisch bidestilliertem Wasser hergestellt:

3-Morpholinopropansulfonsäure	2,09 g	(= 10 mM)
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,46 g	(= 10 mM)
Na_2 - EDTA	o,37 g	(= 1 mM)
Aqua bidest.	ad 1000 ml	

Mit 1 N KOH wurde pH 7,7 eingestellt. Ein Anteil wurde in 5 ml - Portionen tiefgefroren (- 20° C) aufbewahrt.

ATP (Dinatrium-Salz) wurde unter Rühren mit einem Magnetrührer im Eisbad in einem Meßkolben gelöst und eine 1 : 10 - Verdünnungsreihe über 5 Stufen hergestellt von einer Konzentration von 200 nmol / ml bis 20 pmol / ml. Von jeder Verdünnung wurden 1 ml - Proben eingefroren und bei - 20° gelagert; die Zeit vom Lösen des ATP bis zum Einfrieren der letzten Probe dauerte 45 min.
Der Gehalt dieser ATP - Standards wurde mehrfach mit frisch hergestellten Standards verglichen; nach 1-jähriger Lagerung bei - 20° C war die Abnahme nicht meßbar (im Mittel unter 1%).

2.4.3.7 Aktivatorabhängige PDE und Calmodulin aus Meerschweinchenhirn

Einige Proben aktivatorabhängiger PDE und Aktivatorprotein Calmodulin, präpariert aus Meerschweinchenhirn (29, p. 71 ff.), wurden als freundl. Geschenk von Dr. A. du Moulin, Tübingen, zur Verfügung gestellt.
Die Aktivitäten bzw. ihre Hemmung durch 25 µM Trifluoperazin und 1 mM EDTA unter den Meßbedingungen der vorliegenden Arbeit wurden überprüft: Wie Abb. 1 und Tab. 1 zeigen, wurde die Aktivität der PDE - Präparation durch geeignete Verdünnungen der Calmodulin - Präparation dosis-

abhängig stimuliert, während 25 µM Trifluoperazin bzw. 1 mM EDTA die unaktivierte PDE nur wenig beeinflußten, dagegen die Aktivierung durch Calmodulin fast vollständig (Trifluoperazin) bzw. teilweise (EDTA) verhinderten.

Die Präparationen von Calmodulin sowie calmodulinabhängiger PDE zeigten also auch unter den Meßbedingungen vorliegender Arbeit die erwarteten Eigenschaften (Ca^{++}-abhängige, durch 25 µM Trifluoperazin hemmbare Aktivierung) und waren als Vergleichsreagenzien für die späteren Untersuchungen zu benutzen.

Als Reagenz in vorliegender Arbeit wurde die calmodulinabhängige PDE-Präparation in derselben Konzentration wie getestet (1 : 100 verdünnt in Puffer I; ≙ 75 ng Protein im 44 µl - Ansatz) verwendet. Calmodulin wurde in der höchsten getesteten Konzentration (1 : 50 verdünnt in Puffer I; ≙ 100 ng Protein in 44 µl) eingesetzt.
Die aktivatorabhängige PDE-Präparation und die Calmodulinlösung wurden eingefroren bei - 80° C aufbewahrt (dabei blieb die Aktivität über 2 Jahre erhalten); zum Gebrauch innerhalb einiger Tage wurden kleinere Proben bei - 20° C gehalten (Aktivitätsverlust bei - 20° C innerhalb 1 - 2 Wochen).

Tab. 1: Calmodulin und calmodulinabhängige PDE aus Meerschweinchenhirn.

Aktivierung der PDE durch verschiedene Mengen von zugesetzten Calmodulin; Einfluß von 25 µM Trifluoperazin und 1 mM EDTA. Die PDE-Aktivität wurde jeweils in Gegenwart von 10 µM cAMP und 0,2 mM Ca^{++} mit oder ohne Zusatz der Hemmstoffe bzw. von Calmodulin gemessen (entsprechend 3.4.2). Mittelwerte ± SEM (n)

Calmodulin	Aktivierung der PDE	Hemmung durch EDTA		Hemmung durch Trifluoperazin	
		ges.	Hemmung der Aktivierung	ges.	Hemmung der Aktivierung
ng Protein	%	%	%	%	%
---	---	-4,0 ± 5,3 (4)	---	8,6 ± 4,5 (6)	---
6,25	25 ± 14 (4)				
12,5	71 ± 17 (4)	30,9 ± 1,8 (4)	82,1 ± 11,4 (4)	41,8 ± 1,9 (4)	112,5 ± 18,6 (4)
25	153 ± 29 (4)				
50	260 ± 36 (4)				
100	306 ± 36 (6)	52,8 ± 1,3 (4)	68,9 ± 2,6 (4)	72,5 ± 2,8 (6)	97,3 ± 2,5 (6)

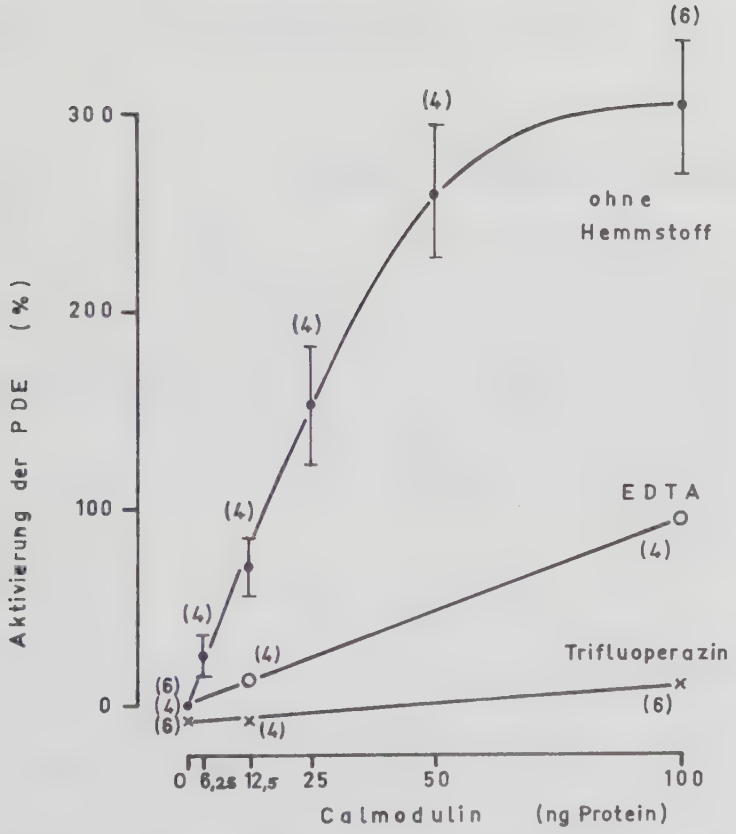


Abb. 1: Calmodulin und calmodulinabhängige PDE aus Meerschweinchenhirn.

Aktivierung der PDE durch verschiedene Mengen von zugesetztem Calmodulin; Einfluß von 25 µM Trifluoperazin und 1 mM EDTA. Die PDE-Aktivität wurde jeweils in Gegenwart von 10 µM cAMP und 0,2 mM Ca^{++} mit oder ohne Zusatz der Hemmstoffe bzw. von Calmodulin bestimmt (entsprechen Mittelwerte ± SEM; in Klammern: n

2.4.4 Reagenzlösungen zur DNA - Bestimmung

2.4.4.1 Diaminobenzoesäure-Reagenz

3,5-Diaminobenzoesäure-Dihydrochlorid wurde (562 mg/ml) in destillierten Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit 10 mg Aktivkohle je ml umgeschüttelt und nach einigen Minuten Stehen bei Raumtemperatur 3 min bei 6500 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde noch ein weiteres Mal ebenso mit Aktivkohle (10 mg/ml) gereinigt.
Das Diaminobenzoesäure-Reagenz wurde jeweils frisch hergestellt.

2.4.4.2 DNA - Standards

DNA aus Kälberthymus wurde (10 mg/ 20 ml) in 1 N Ammoniaklösung (aus 25 % NH_3 p.A. hergestellt) gelöst. Weitere Verdünnungen wurden mit destilliertem Wasser hergestellt und Aliquots enthaltend 400 ng, 200 ng, 150 ng, 100 ng, und 50 ng DNA wurden in Eppendorf-Gefäßen (wie auch zur DNA-Bestimmung verwendet) eingetrocknet. Die DNA - Standards wurden verschlossen im Tiefkühlschrank (- 20° C) aufbewahrt.

2.5 Isolierung der Langerhansschen Inseln (nach 46)

Bei der mit Äther narkotisierten Ratte wurde durch einen Längsschnitt bis zum Brustbein und je einen Querschnitt im Becken und unter den Rippenbögen das Abdomen geöffnet. Unter den Leberlappen wurde das Duodenum mit einer Pinzette hervorgezogen, um den Ductus pancreaticus sichtbar zu machen und um ihn zur Leber hin abbinden zu können. Anschließend injizierte man 10 ml eiskalte Hanks' Lösung durch den Ductus pancreaticus in das Pancreas. Mit einer Schere ließ sich sodann das deutlich sichtbare Pancreas von Darm, Magen, Milz und Leber abtrennen, in eine mit Hanks' Lösung gefüllte Petrischale legen und von sämtlichen Fettpartikeln befreien.
Die Zerkleinerung des Pancreas erfolgte mittels einer kleinen Schere möglichst gleichmäßig und so fein, daß sich die Teilchen durch den Konus einer 5 ml Recordspritze aufsaugen ließen.
Das Volumen wurde mit Hanks' Lösung auf 5 ml ergänzt und der gesamte Inhalt der Spritze dann in ein 20 ml Schnappdeckelglas überführt, das 30 mg Collagenase enthielt. In einem auf 37° C thermostatisierten Schüttelbad ließ man die Collagenase unter kräftigem Schütteln so lange auf das Pancreasgewebe einwirken, bis eine homogene, hellbraune schleimige Flüssigkeit entstanden war (ca. 8 - 10 min, je nach Aktivität der Collagenase und Größe der Pancreaspartikel).

Anschließend wurde der gesamte Inhalt in ein kleines Becherglas eingefüllt, 3-mal durch den Konus der 5 ml-Recordspritze gesaugt (zur weiteren Zerkleinerung) und durch ein Plastiksieb in einen mit ca. 15 ml eiskalter Hanks' Lösung gefüllten Meßzylinder gegossen. Auf diese Weise wurde die Collagenaseverdauung gestoppt.
Wegen der unterschiedlichen Dichte von exokrinen Partikeln und Inseln war es möglich, beide voneinander durch Sedimentation zu trennen, indem man die Inseln im Meßzylinder absetzen ließ, den Überstand absaugte und erneut mit eiskalter Hanks' Lösung aufschwemmte. Dieser Vorgang wurde ca. 8 mal wiederholt, bis der größte Teil des exokrinen Gewebes entfernt war und sich die isolierten Inseln am Boden des Gefäßes mikroskopisch erkennen ließen. Alle Arbeitsschritte erfolgten im Eisbad bei 0^{o} C. Durch sorgfältiges Auslesen mit einer Mikropipette unter dem Stereomikroskop wurden die Inseln vollständig vom exokrinen Gewebe getrennt und bis zur Vorinkubation oder Perifusion kurze Zeit in Hanks' Lösung im Eisbad gehalten.

2.6 Vorinkubation der Inseln

Für einige Vorversuche, bei denen die Langerhansschen Inseln nicht perifundiert werden sollten, wurden sie zur Stoffwechselregenerierung und Äquilibrierung nach dem Isolierungsprozeß erst vorinkubiert. Dazu wurden die isolierten Inseln in ein 5 ml - Gläschen gegeben, die hierbei mit überführte Hanks' Lösung wurde nach dem Absetzen der Inseln abgesaugt. Zu den Inseln gab man 2 ml KRB - Albumin-Lösung, die 0,8 mg/ml Glucose enthielt. Das Glas wurde mit einem Gummistopfen verschlossen, über eine Kanüle mit Carbogen begast und 30 min bei 37° C im Wasserbad langsam geschüttelt. Nach der Vorinkubation wurden die Inseln im Eisbad 3 mal mit eiskalter Hanks' Lösung gewaschen.

2.7 Perifusion

2.7.1 Aufbau der Perifusionsapparatur

Die verwendete Perifusionsapparatur war aufgebaut aus zwei Vorratsgefäßen für die beiden Perifusionsmedien, einem Umschaltventil, einer Schlauchpumpe für bis zu 8 parallel betriebene Kanäle, den Perifusionskammern, in denen sich die isolierten Inseln befanden, und einem Fraktionssammler zum Auffangen des Mediums für Insulinbestimmungen. Vorratsgefäße und Perifusionskammern mit Zuleitungen befanden sich in einem auf 37° C thermostati-

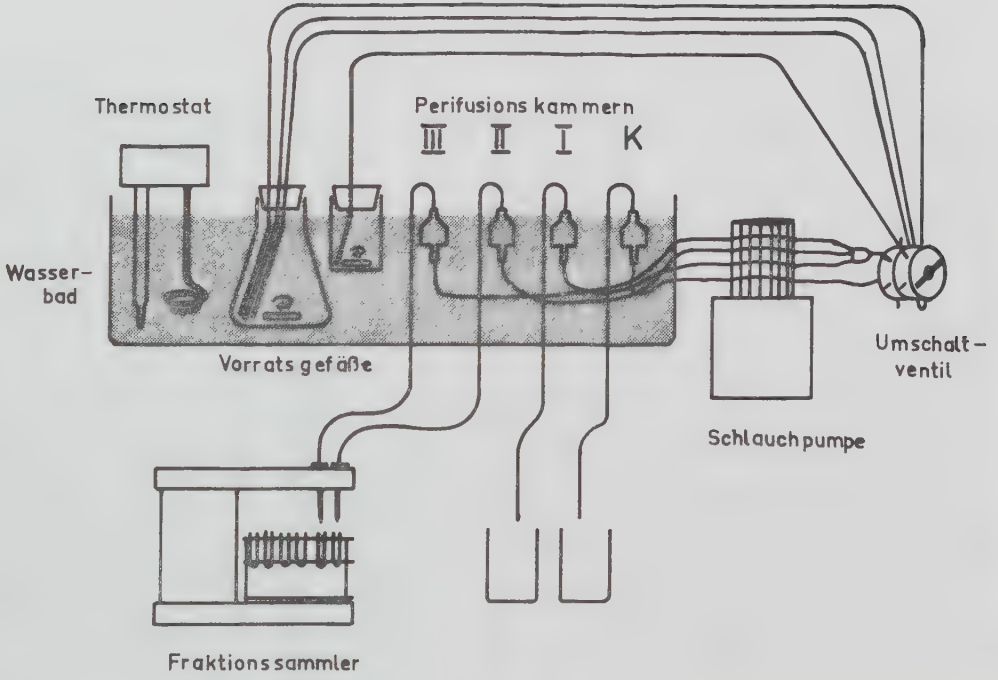


Abb. 2: Perifusionsapparatur für isolierte Langerhanssche Inseln

sierten Wasserbad (Abb. 2).

In den Vorratsgefäßen wurden die Perifusionsmedien laufend mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) begast durch eine dicht über die Flüssigkeitsoberfläche geführte Kanüle; zur besseren Gas-Sättigung wurden die Lösungen mit Magnetrührern dabei langsam gerührt. Gleichmäßige Begasung ist wichtig zur Konstanthaltung des pH-Werts des KRB - Perifusionsmediums. Sie wurde kontrolliert, indem man die Vorratsgefäße mit durchbohrten Gummistopfen dicht verschloß und das ausströmende Gas in ein wassergefülltes Reagenzglas perlen ließ.

Das Umschaltventil gestattete die parallele Umschaltung jeweils zweier Kanäle und war so angeschlossen, daß nur ein Kanal zwischen beiden Perifusionsmedien umgeschaltet werden konnte, während der andere an beiden Eingängen Vorperifusionsmedium erhielt und damit in jeder Schaltstellung (als Kontroll - Kanal) nur Vorperifusionsmedium lieferte. An beide Ausgänge des Umschaltventils ließen sich durch Verteilerstücke bis zu 4 Pumpenschläuche anschließen, die dann am Ausgang der Schlauchpumpe zu je einer Perifusionskammer führten.

Als Perifusionskammern dienten modifizierte Spritzenvorsatz - Filterhalter: auf der Eingangsseite war ein kurzes Kanülenrohrstück als Schlauchanschluß angebracht mittels eines eingepressten Teflonzylinders; die Ausgangsseite hatte bereits einen Stutzen mit "Luer" - Gewinde und wurde mit schraubbaren Schlauchansatzstücken verbunden (Abb.3).

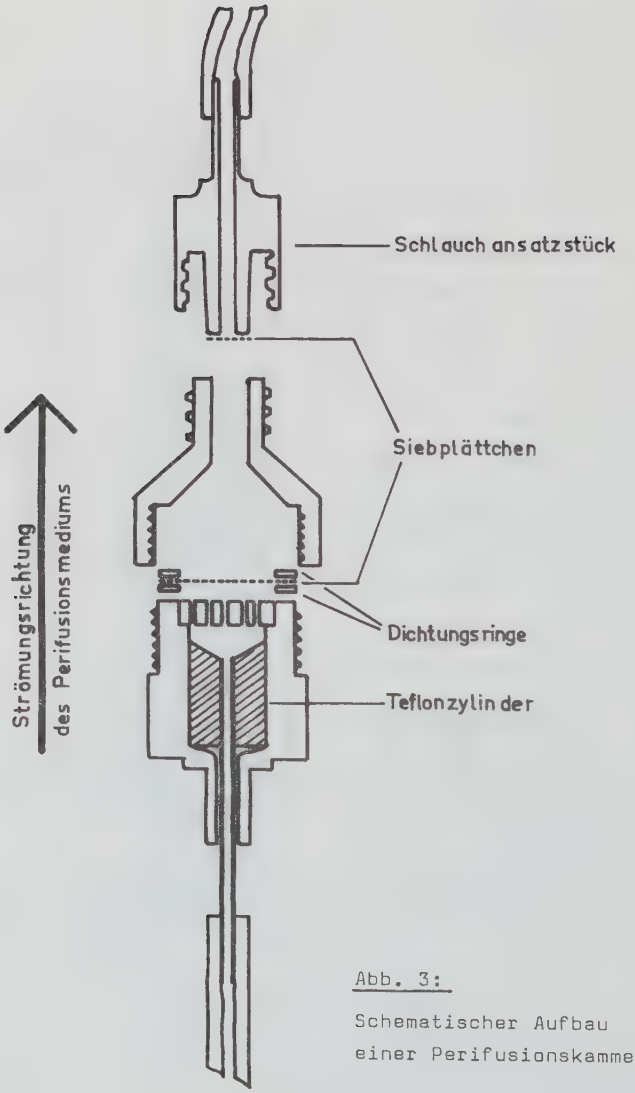


Abb. 3:

Schematischer Aufbau
einer Perifusionskammer

In die Perifusionskammern eingelegt war ein rundes Siebplättchen (aus Nylongeflecht von 37 um Porenweite ausgestanzt, Ø 13 mm); ein Stück desselben Nylongeflechts war über die Öffnung der Schlauchansatzstücke geklebt. Im Raum zwischen beiden Filtern befanden sich bei der Perifusion die Langerhansschen Inseln, die während der Perifusionszeit gut an das untere 13 mm Ø Filterplättchen anhafteten und mit diesem nach beendeter Perifusion aus der trockengesaugten, geöffneten Kammer genommen werden konnten.

Als Verbindung wurden Teflonschläuche verwendet (Zuleitungen der einzelnen Kammern: 0,7 / 1,6 mm Innen- / Außen - Ø ; sonst 1,o / 1,6 mm Ø).

Eine bis zwei Perifusionskammern waren an den Fraktionssammler angeschlossen; die Schlauchausgänge der anderen Kammern wurden auf demselben Niveau befestigt: 11 cm unterhalb der Kammern. Damit ergab sich bei der verwendeten Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min ein Innendruck in den Perifusionskammern zwischen 4 und 12 Torr (0,5 - 1,6 kPa) (s. 3.1.2).

2.7.2 Durchführung der Perifusionen

Jeweils 50 Langerhanssche Inseln wurden in einer Kammer bei 0,5 ml/min Durchflußgeschwindigkeit perifundiert. Vor Versuchsbeginn wurden die Perifusionsmedien in den Vorratsgefäßen bereits 15 min lang auf 37° C erwärmt und unter Rühren mit Carbogen begast.
Dann wurde die Schlauchpumpe eingeschaltet, um die Schläuche der Perifusionsapparatur blasenfrei zu füllen. Die Perifusionskammern wurden mit einem Siebplättchen bestückt, zusammengeschraubt, in einer Halteklammer senkrecht befestigt und mittels einer 2 ml - Spritze vom unteren Anschluß her blasenfrei mit Vorperifusionsmedium gefüllt. Durch den oberen Kammerausgang wurden mittels einer 50 µl - Konstriktionspipette 50 Inseln auf das Siebplättchen in der Kammer pipettiert, wobei mit der noch am unteren Kammereingang angeschlossenen 2 ml - Spritze vorsichtig das entsprechende Volumen abgezogen wurde. Darauf wurde das Schlauchansatzstück am oberen Kammerausgang eingeschraubt, und die Kammer wurde mit den bereits mit Medium durchströmten Schläuchen der Perifusionsapparatur verbunden und im 37° C - Wasserbad senkrecht befestigt.
Auf diese Weise wurden meist 4 Kammern innerhalb etwa 15 min mit Inseln bestückt und parallel betrieben. Um systematische Fehler zu vermeiden, wurden die Perifusionskanäle in der Reihenfolge einer Zufallszahlenreihe zuge-

ordnet und in entsprechender Reihenfolge gefüllt. Während einer Vorperifusionsperiode von 40 min wurden alle Kammern mit "Vorperifusionsmedium" (KRB - Lösung mit 0,5 % Albumin - s. Kap. 2.4.2 - , enthaltend 0,8 mg/ml Glucose) durchströmt. Diese Vorperifusionsperiode diente der Äquilibrierung und Stoffwechselregenerierung der Inseln nach dem Isolierungsprozess. Danach schloß sich die verschieden lang dauernde Hauptperifusion an mit verschiedenen Zusätzen zum Medium. Zur Bestimmung der Insulinsekretionskurve (bei späteren Perifusionsversuchen als Kontrolle) wurde das Perifusionsmedium aus 1 - 2 Kammern im Fraktionssammler aufgefangen: während der Vorperifusionsphase im 5 min - Fraktionen; ab 1 min vor dem Umschalten auf Hauptperifusionsmedium in 30 sec - Fraktionen während der ersten 10 min Hauptperifusion; danach weitere 20 min lang in 2 min - Fraktionen.

2.7.3 Perifusionsstop und Bereitung der Inselhomogenate zur PDE - Bestimmung

Die gemessene biphasische Insulinsekretionskurve (s. 4.2.1) besaß einen ersten Gipfelwert in der aufgefangenen Fraktion von 3 - 3 $^1/_2$ min, eine Abnahme nach 6 min, und einen stetigen Anstieg bis 30 min, je vom Zeitpunkt der Umschaltung auf 3 mg Glucose / ml gerechnet. Daher sollte nach diesen Perifusionsintervallen die PDE - Aktivität der

Langerhansschen Inseln bestimmt werden. Dementsprechend wurden also meist 4 Kammern parallel durchströmt. Nach 0 min (= Kontrolle), 2:45 min, 5:30 min, und 30 min wurde jeweils eine Kammer schnell von den Schlauchverbindungen gelöst, in einer senkrechten Halterung trockengesaugt (mittels der 2 ml - Spritze), geöffnet, und die Nylonfilter mit anhaftenden Inseln in ein 2 ml - Reagenzglas mit flüssigem Stickstoff getaucht. Dies dauerte 30 sec.
Um die momentanen Enzymaktivitäten entsprechend den einzelnen Perifusionsintervallen festzustellen, erwies sich Gefrierstop in flüssigen Stickstoff als günstig. Die Aktivierung der low-K_m PDE in Fett- und Lebergewebe war gezeigt worden nur nach Einwirkung von Insulin auf intakte Zellen, nicht aber auf Homogenat (44, 51, 59); diese Stimulierung war bereits nach wenigen Secunden Insulineinwirkung signifikant (44, 51), überdauerte andererseits längere Aufarbeitungsprozeduren einschließlich Auftrennung von Zellfraktionen durch Ultrazentrifugation (44).
Daher wurden die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Langerhansschen Inseln direkt gefriergetrocknet. So sollte vermieden werden, daß die PDE eventuell noch intakter Zellen durch in großen Mengen freigesetztes Insulin während der Aufarbeitung verändert würde. Dieselbe Aufarbeitungsmethode war zur Untersuchung von Glucoseeinflüssen auf die PDE-Aktivität kultivierter Inseln benutzt worden (14).
Die Filter mit anhaftenden Inseln wurden also gefrierge-

trocknet und über Nacht bei -30^{o} C tiefgefroren gehalten. Zur Bestimmung der PDE-Aktivität wurde nacheinander zu jedem Gläschen 500 µl eiskalter Puffer I (2.4.3.1) zugegeben und sofort 3 x 3 sec. mit einer Ultraschallsonde homogenisiert (s. 2.7.3.1). Vom gut aufgeschüttelten Homogenat wurden sofort 3 x 50 µl - Aliquots zur DNA - Bestimmung abpipettiert und bis zur Messung eingefroren. Das restliche Inselhomogenat wurde gemischt mit demselben Volumen an eiskaltem Puffer I, enthaltend zusätzlich 1 mM GMP, und sofort zur Bestimmung der PDE-Aktivität benutzt.

2.7.3.1 Versuche zur Bereitung des Inselhomogenats

Verschiedene Methoden zum Gewebeaufschluß wurden auf Anwendbarkeit geprüft.
Nach Behandlung im Ultraschallbad in hypotoner (50 %) KRB - Albumin-Lösung wie auch in Puffer I (etwa gleich hypoton, pH 8,0) waren Langerhanssche Inseln noch nach 10 min im mikroskopischen Bild in unveränderter Größe zu erkennen.

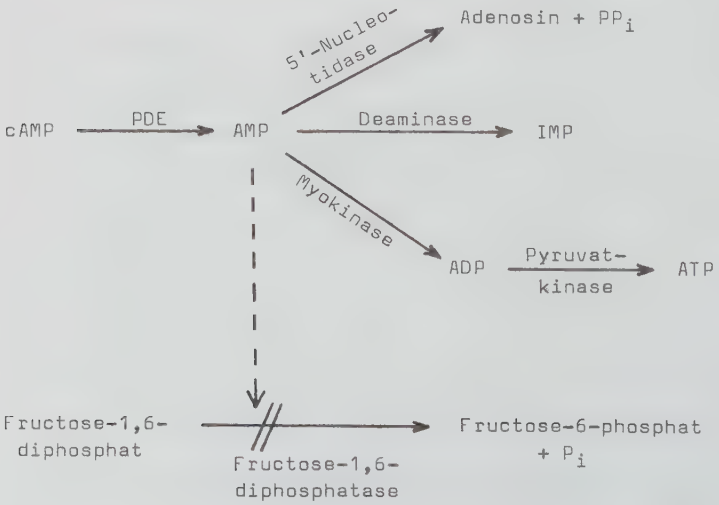
Auch durch 5-minütiges Schütteln im hypotonen Medium in einer quadratischen Glasküvette wurden frisch vorinkubierte Inseln nicht zerteilt.
Angewandt wurde schließlich eine Ultraschallsonde: nach 5 sec Beschallung waren mikroskopisch keine Inselreste mehr zu erkennen.
Um Erwärmung zu vermeiden, wurde in kurzen Abständen

3 x 3 sec unter Kühlen im Eisbad homogenisiert und dazwischen eventuell an der Glaswandung abgesetzte Inseln kurz aufgeschüttelt.

2.8 Bestimmung der PDE - Aktivität Langerhansscher Inseln

2.8.1 Verschiedene Methoden zur PDE - Bestimmung

Die meisten gebräuchlichen Methoden zur Bestimmung der Phosphodiesteraseaktivität beruhen auf Kombinationen einiger enzymatischer Reaktionsschritte:



2.8.1.1 Methode nach Butcher und Sutherland

Die ursprüngliche PDE - Bestimmung nach Butcher und Sutherland (20) benutzt die Hydrolyse des von der PDE gebildeten AMP mittels einer 5'-Nucleotidase aus Schlangengift zu Adenosin und anorganischem Phosphat. Letzteres wird colorimetrisch mit Hilfe von Ammoniummolybdat bestimmt:

$$cAMP \xrightarrow{PDE} AMP \xrightarrow{Nucleotidase} Adenosin + PP_i$$

Die erreichbare Empfindlichkeitsgrenze ist mit 20 µM angegeben.

2.8.1.2 Methode nach Thompson und Appleman, bzw. Variation nach Loten und Sneyd

Dieselben enzymatischen Schritte benutzt die augenblicklich wohl am häufigsten angewandte Methode von Thompson und Appleman (72), die jedoch durch Verwendung von ^3H-markiertem cAMP um mindestens 3 Größenordnungen empfindlicher ist. Das schließlich gebildete ^3H - Adenosin wird von den negativ geladenen Nucleotiden ($cAMP^-$, AMP^{--}) abgetrennt, indem diese an zugesetzte Anionenaustauscher-Harze gebunden werden (Variation von Loten und Sneyd (52): Säulenchromatographie an Ionenaustauschern), und im Szintillationszähler bestimmt.
Vorteile der Methode sind ihre höchste Empfindlichkeit und einfache Anwendung; allerdings sind bestimmte

günstige Reaktionsbedingungen zur Vermeidung mangelhafter Adenosin-Wiederfindung oder hoher Blindwerte und störender Nebenreaktionen in Gewebshomogenaten zu sichern (16, 31, 57).

2.8.1.3 Methode nach Drummond und Perrot-Yee, bzw. Variation nach Dedman und Means

Die Methode nach Drummond und Perrot-Yee (28) beruht auf der Desaminierung des AMP zu IMP und Messung der damit verbundenen Extinctionsabnahme (von AMP) bei 265 nm:

$$cAMP \xrightarrow{PDE} AMP \xrightarrow{Deaminase} IMP$$

Führt man beide enzymatischen Schritte gleichzeitig in einer Mikroküvette im UV - Photometer durch (Dedman und Means (26)), so kann durch einen angeschlossenen Schreiber der Extinctionsabfall und damit die PDE-Aktivität kontinuierlich verfolgt werden. Dieser Vorteil gegenüber anderen "Zweipunkt-Messungen" steht dem Nachteil einer vergleichsweise hohen Nachweisgrenze von 0,5 nmol/min PDE-Aktivität gegenüber. Die in vorliegender Arbeit zu messenden PDE-Aktivitäten lagen um 2 - 3 Größenordnungen tiefer.

2.8.1.4 Methode nach Pöch

Den Vorteil recht einfacher Handhabung hat auch die PDE - Bestimmungsmethode nach Pöch (60), die direkt die

PDE - Hydrolyse von radioaktiv markiertem cAMP als einzigen enzymatischen Schritt bestimmt. Im Gegensatz zu cAMP wird das gebildete AMP durch Mitfällung mit einem aus $ZnSO_4$ und $Ba(OH)_2$ frisch gebildeten $BaSO_4$ - Niederschlag abgetrennt. Durch Messung der verbleibenden Radioaktivität im Überstand kann direkt das nicht hydrolysierte cAMP bestimmt werden Störungen durch Nebenreaktionen in ungereinigten Gewebshomogenaten können leicht umgangen werden; jedoch ist die Empfindlichkeit ebenfalls für Messungen der low-K_m PDE in wenigen ug Gewebe (z.B. Langerhansschen Inseln) zu gering.

2.8.1.5 Methode nach Han et al. (32)

Kürzlich wurde eine andersartige PDE - Bestimmungsmethode beschrieben (32), die auf der Hemmung der Fructose-1,6-diphosphatase durch AMP beruht. Photometrisch gemessen wird nach 3 enzymatischen Schritten die Zunahme von reduziertem NADPH; als Empfindlichkeitsgrenze wird 50 pmol AMP angegeben.

2.8.1.6 Methode nach Johnson et al. (Luciferase - Methode)

Den Vorteil nicht radioaktiver Arbeitsweise mit sehr hoher Empfindlichkeit verbindet eine ursprünglich zur Messung von cAMP beschriebene Methode (37), die entspre-

chend abgewandelt auch zur Bestimmung der PDE - Aktivität verwendet wird (8 , 83). Sie beruht auf enzymatischer Phosphorylierung des AMP zu ATP und Messung des gebildeten ATP mittels Luciferase in einem Lumineszenz-Photometer:

$$cAMP \xrightarrow{PDE} AMP$$

$$AMP + ATP \underset{}{\overset{Myokinase}{\rightleftharpoons}} 2\ ADP$$

$$ADP + PEP \xrightarrow[\#]{Pyruvatkinase} ATP + Pyruvat$$

ATP-Messung mittels Luciferase (E) und Luciferin (LH_2):

$$ATP + LH_2 \underset{}{\overset{E;\ Mg^{++}}{\rightleftharpoons}} E \cdot LH_2 \cdot AMP + PP_i$$

$$E \cdot LH_2 \cdot AMP \xrightarrow[\#]{O_2} E{\cdot}P + AMP + CO_2 + Licht$$

(E·P = Oxyluciferin)

(Reaktionsgleichungen nach 27 , 83)

Für die Messung der PDE-Aktivität in wenigen ug Gewebe (isolierte Langerhanssche Inseln) kommen aufgrund ihrer Empfindlichkeit von den aufgezählten Methoden nur die Methode von Thompson und Appleman (2.8.1.2) und die Luciferase-Methode (2.8.1.6) in Betracht. Wegen eines vorhandenen Lumineszenz-Photometers und wegen der nichtradioaktiven Arbeitsweise wurde die letztere benutzt und zur Anwendung in vorliegender Arbeit modifiziert.

2.8.2 Beschreibung der verwendeten Methode

2.8.2.1 Durchführung

Von jeder Probe Inselhomogenat, enthaltend 0,5 mM GMP (s. 2.7.3) wurden 6 x je 88 µl in verschließbare 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert.
Zu 2 Anteilen wurden als Blindwerte je 88 µl Puffer I pipettiert und die verschlossenen Gefäße wurden 4 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Diese Blindwerte dienten zur Korrektur sowohl des Reagentien-Leerwerts, als auch vor allem der in den Inseln enthaltenen Adenosin-Nucleotide (AMP, ADP, ATP), die bei der verwendeten Meßmethode als wesentlicher Anteil des Blindwerts miterfaßt werden.

In den übrigen Anteilen des Inselhomogenats wurde die PDE-Reaktion gestartet durch Zugabe von je 88 µl Puffer I mit 2 µM bzw. 20 µM cAMP; die verschlossenen Gefäße wurden umgeschüttelt und 60 min im 37° C Wasserbad inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion und Inaktivierung der PDE wurden die Gefäße danach ebenfalls 4 min im siedenden Wasserbad erhitzt.
Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde zu allen Ansätzen 25 µl Reagenz II (s. 2.4.3.2) pipettiert; die verschlossenen, umgeschüttelten Reaktionsgefäße wurden für weitere 120 min bei 37° C inkubiert.
Danach wurde ohne Abstoppen der Reaktion von den im Wasserbad gehaltenen Proben zur ATP-Messung jeweils 10 µl

mittels einer Hamilton-Spritze in 100 µl Luciferase-Reagenz (s. 2.4.3.3 und 2.4.3.4) injiziert, das in einer Glasküvette vor den Photovervielfacher eines Lumineszenz-Photometers eingebracht worden war. Der Spitzenwert des dabei entstehenden schwachen Lichtblitzes ist - bei schneller Vermischung von Reagenz und ATP-Probe - der ATP-Menge proportional (68) und wird bei dem verwendeten Lumineszenz-Photometer gemessen.

2.8.2.2 Ausrechnung der PDE-Bestimmung entsprechend der Wiederfindung von AMP-Verdünnungsreihen

AMP, welches durch Phosphodiesterase aus cAMP entstand, wurde in Gegenwart von Inselhomogenat schnell weiter abgebaut (s. 3.2.4); auch bei der ausgearbeiteten Methode unter Zusatz von 0,25 mM GMP war die Wiederfindung nach der 60-minütigen Inkubation I (PDE-Reaktion) unter 100%. Daher wurde bei jeder einzelnen PDE-Bestimmung auch eine AMP-Standardreihe in Gegenwart von Inselhomogenat mitbestimmt und die Ergebnisse der PDE-Bestimmungsansätze nach der AMP-Wiederfindung ausgerechnet.
Diese Korrektur - obwohl nur näherungsweise, da das AMP im PDE-Ansatz ja erst während der 60 min gleichmäßig gebildet wird, und nur gemittelt für die Ansätze jedes Versuchs - war doch zuverlässig anwendbar bei der nicht stark verringerten Wiederfindungsrate (im Mittel 87%)

und hatte den Vorteil, ebenso etwaige störende Reagentienunterschiede wie Reaktionsunlinearitäten zu erfassen:
Das restliche Inselhomogenat aller Proben aus dem Versuch (≙ gleichbehandelte Langerhanssche Inseln derselben Ratte) nach Abpipettieren der Aliquots zur PDE-Bestimmung wurde gemischt. Parallel mit den PDE-Bestimmungsansätzen wurden entsprechende 88 ul - Aliquots anstelle des cAMP - Puffers I mit je 88 ul einer AMP - Verdünnungsreihe enthaltend 0 , 25 , 50 , 100 , 200 pmol AMP (frisch hergestellt, s. 2.4.3.5) für 60 min bei 37° inkubiert. Alle Behandlungsschritte waren gleich wie bei den Ansätzen zur PDE-Bestimmung.
Als Bezugsgröße für die so bestimmten PDE-Aktivitäten wurde der DNA - Gehalt jedes Perifusionsansatzes von 50 Inseln gemessen. Im Ergebnis wurde die PDE-Aktivität ausgedrückt in:

$$\frac{\text{pmol cAMP}}{\text{h} \cdot \text{ng DNA}}$$

2.8.2.3 Schema: Endkonzentrationen im Bestimmungsansatz

	Inkubation I 60 min/37°	Inkubation II + 120 min/37°
Glycylglycin (Puffer pH 8,o)	50 mM	50 mM
Mg^{++}	2 mM	2 mM
Ca^{++}	o,2 mM	o,2 mM
Rinderserumalbumin	o,3 mg/ml	o,3 mg/ml
GMP	o,25 mM	o,25 mM
cAMP	1 bzw. 10 mM	-
Dithiothreit		250 µM
Phosphoenolpyruvat		125 µM
ATP - Vorgabe (2 pmol)		10 nM
gebildetes AMP (max. ca 150 pmol)		max. ca. o,8 µM
Myokinase		o,9 U
Pyruvatkinase		o,5 U
(aus dem Myokinase- und Pyruvatkinase-Präparat:		
$(NH_4)_2\ SO_4$		20 mM
Glycerin		3 mg/ml

2.9 DNA - Bestimmung

Die DNA-Bestimmung erfolgte nach Beckmann (10, 11) mit geringen Veränderungen. Zugrunde liegt eine spektrofluorimetrische Methode von Kissane und Robbins (42), die die Bildung eines stark fluoreszierenden Produkts aus 2-Desoxy-Aldosen mit 3,5-Diaminobenzoesäure in stark saurer Lösung benutzt.
Die DNA-Bestimmung nach Beckmann erfolgt in intakten Langerhansschen Inseln (etwa 20 je Ansatz (11)); in der vorliegenden Arbeit wurde sie zur Messung von DNA im Homogenat (entsprechend 5 Inseln) benutzt.

2.9.1 Durchführung der DNA - Bestimmung

Die eingetrocknet aufbewahrten DNA-Standards (2.4.4.2) wurden mit je 50 µl Puffer I versetzt, um dieselben Verhältnisse wie in den Bestimmungsansätzen zu schaffen. Zu den frisch aufgetauten Inselhomogenat-Aliquots und den gelösten DNA-Standards wurden jeweils 50 µl Diaminobenzoesäurereagenz (2.4.4.1) pipettiert, umgeschüttelt, und die verschlossenen Reaktionsgefäße wurden zur Reaktion 40 min bei 60° C im Wasserbad erhitzt.
Danach wurden die Ansätze aus dem Wasserbad genommen, je 500 µl kalte 1 N HCl zugegeben, und anschließend die Fluoreszenz gemessen (Anregungswellenlänge 420 nm; Emission: 500 nm).
DNA-Bestimmungen wurden in 3-fach-Ansätzen ausgeführt; die DNA-Standardreihe in Doppelbestimmung.

2.10 Insulinbestimmung

Die Messung der Insulinkonzentration im Perifusionsmedium erfolgte in Doppelbestimmungen durch Radioimmunoassay (Doppelantikörpermethode (66)), und zwar auf der Basis des Radioimmunoassay Kit (Insik-I). Zur Erstellung der Eichkurve verwendete man Ratteninsulin. Den zu bestimmenden Proben sowie den Standardinsulinlösungen wurden jeweils 50 µl entnommen und mit ebenfalls 50 µl eines 50 mM Glycylglycin-Puffers (pH 7,4) versetzt.
Als Leerwert legte man 100 µl der entsprechenden Mischung aus Perifusionsmedium und 50 mM Glycylglycin-Puffer vor. Anschließend wurde der lyophilisierte Antikörperkomplex nach Vorschrift gelöst und jeweils 100 µl davon den Proben zugefügt. Nach sorgfältigem Schütteln verblieben alle Proben für 6 Stunden bei 4^{o} C im Kühlschrank. Nach der Zugabe von jeweils 100 µl des gelösten ^{125}Jod-markierten Insulins verblieben die Proben wiederum bei 4^{o} C im Kühlschrank, dieses Mal 18 Stunden lang. Dann setzte man allen Gläschen 1 ml kalten Puffer (laut Vorschrift) zu und zentrifugierte 20 min lang mit 3500 UpM bei 4^{o} C. Der Überstand wurde sofort abgekippt und die Zentrifugenröhrchen umgekehrt aufgestellt, um die am oberen Rand noch anhaftenden Tröpfchen ablaufen zu lassen. Dann folgte die Messung im automatischen Gamma-Counter (ca. 3 min lang, bei Zählraten von ca. 600 - 2500 CpM).

Berechnung der Insulinwerte:

Aus den Doppelbestimmungen wurde der Mittelwert der Zählraten errechnet. Es wurde dann der Quotient gebildet aus der jeweiligen Zählrate der Proben und der gemittelten Zählrate des Leerwertes. Anhand einer ebenfalls auf diese Weise erstellten Eichkurve im Bereich von 0 - 200 µU/ml konnten die Insulinwerte der Proben errrechnet werden.

3. ERGEBNISSE - METHODISCHER TEIL

3.1 Entwicklung und Erprobung der Perifusionsapparatur

3.1.1 Umschaltung der Perifusionsmedien

Der erste Gipfel der biphasischen Insulinsekretionskurve perifundierter Langerhansscher Inseln erscheint (bei vergleichbaren Perifusionssystemen) etwa 2 - 4 min nach beginnender Glucosestimulierung (39, 49, 50, 87); in der vorliegenden Arbeit nach 3 min (s. Kap. 4.2.1). Es mußten also Verhältnisse geschaffen werden, die beim Umschalten ein entsprechend schnelles Auswaschen und Ersetzen des ersten Mediums durch das nachfolgende ermöglichten. Zur Überprüfung und Verbesserung der schnellen Umschaltung wurden

(1) destilliertes Wasser und

(2) Lebensmittelrot - Lösung (1,5 mg/ 100 ml dest. Wasser)

als "Perifusionsmedien" verwendet und der Farbstoffanteil im Medium nach Durchströmung des gesamten Perifusionskanals photometrisch bestimmt ($\lambda_{max} = 523$ nm, E_{523} der Lebensmittelrot - Lösung etwa o,73): die schnellere oder langsamere Extinctionszunahme oder -abnahme in den in 30 sec - Intervallen aufgefangenen Fraktionen zeigte die mehr oder weniger gute "Trennung" der Medien beim Umschalten an (Abb. 4).

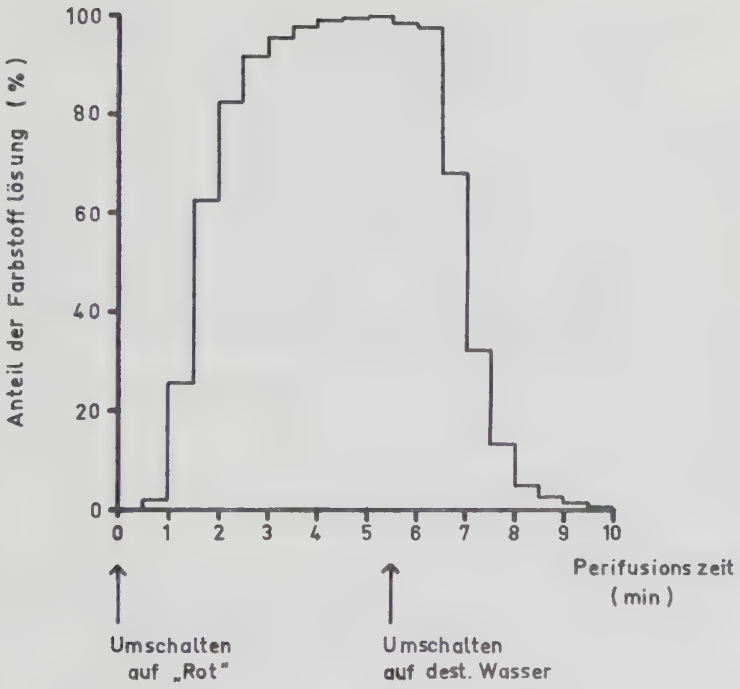


Abb. 4: Ansteigen des Prozentanteils eines neuen Mediums beim Umschalten; gemessen nach Durchströmung des gesamten Perifusionskanals.
Als "Medium" wurde Farbstofflösung verwendet und die Extinction gemessen.
(Mittelwert von 2 Versuchen)

Die Funktion der Perifusionsapparatur wurde in mehreren Schritten optimiert unter Verringerung des Volumens der Perifusionskanäle auf o,85 ml (gemessen insgesamt vom Umschaltventil bis zum Fraktionssammler); als günstig erwies sich die Verringerung des Kammervolumens durch den eingepressten Teflonzylinder und die Verwendung des totvolumenfreien Umschaltventils. Bei der endgültigen Anordnung der Perifusionsapparatur waren 80% des neuen Mediums erreicht in der Fraktion 2 min nach Umschalten (Abb. 4).

Daraus folgt, daß die gemessene Insulinsekretionskurve resultiert aus:

(a) dem tatsächlichen Zeitverlauf der Inulinsekretion der Langerhansschen Inseln

(b) der Qualität der Perifusionsapparatur hinsichtlich der Geschwindigkeit von Konzentrationsänderungen bzw. Vermischungsvorgängen innerhalb des Perifusionskanals.

Die erreichbare Geschwindigkeit von Konzentrationsänderungen im Medium wird hauptsächlich mitbestimmt vom Verhältnis des Volumens eines Perifusionskanals zur Durchflußgeschwindigkeit. Dieses Verhältnis ist bei der hier beschriebenen Perifusionsapparatur vergleichbar mit Angaben anderer Autoren (Tab. 2) , ebenso wie der Verlauf der gemessenen Insulinsekretionskurve (beurteilt z.B. nach dem Auftreten des ersten Gipfelwerts der Insulinsekretion im Medium, s. oben; bzw. s. Kap. 4.2.1).

Tab. 2: Vergleich von Volumenverhältnissen und Durchflußgeschwindigkeit bei der eigenen Perifusionsanordnung mit Angaben anderer Autoren.

Volumen eines Perifusionskanals	Volumen der Perifusionskammer	Durchflußgeschw.	Referenz
0,85 ml	0,45 ml	0,5 ml/min	eigene Perifusionsanordnung
1,4 ml		1,4 ml/min	41
1,4 ml	70 µl	1,2 ml/min	50
	0,7 ml	2-2,5 ml/min	40, 49
35 µl		35 µl/min	36
	0,9 ml	0,8 ml/min	39
2,5 ml		1 ml/min	87

3.1.2 Druckverhältnisse in den Perifusionskammern

Isolierte Langerhanssche Inseln in vitro sind empfindlich gegen Druckschwankungen. So kann durch plötzliche Änderungen des osmotischen Drucks, z.B. durch Weglassen einer Substanz aus der Zusammensetzung des Perifusionsmediums (15, 61), wie auch durch Druckschwankungen beim Umschalten der Perifusionsmedien (36), eine unphysiologische Insulinfreisetzung hervorgerufen werden, die dann sogar als erster

Gipfel einer biphasischen Insulinsekretionskurve mißinterpretiert werden könnte (36).
Problematisch kann auch zu starkes Pulsieren der verwendeten Schlauchpumpe sein; das wird teilweise umgangen, indem man das Medium allein unter hydrostatischem Druck aus höher angeordneten Vorratsgefäßen durch die Kammern strömen läßt und die Pumpe danach anordnet nur zur Durchflußgeschwindigkeitsstabilisierung (36). Bei eigenen Vorversuchen verstopfte das anfänglich verwendete Membranfilter (8 µm Porengröße, wie z.B. bei (19)) in der Kammer stets schnell durch Verunreinigungen des im Medium gelösten Albumins und wurde daher schließlich durch die kaum Strömungswiderstand bietenden Nylon-Siebplättchen mit 37 µm Porenweite ersetzt.

Um sicherzugehen wurde der Innendruck einer Perifusionskammer der verwendeten Apparatur geprüft. Dazu wurde eine Perifusionskammer mit einer seitlichen Bohrung versehen und ein Miniaturdruckaufnehmer eines elektrischen Manometers angeschlossen. Bei der endgültigen Anordnung und 0,5 ml / min Durchflußgeschwindigkeit schwankte der Kammerinnendruck zwischen 4 und 12 Torr (0,5 - 1,6 kPa), bedingt durch das Pulsieren der Schlauchpumpe, mit einer "etwa physiologischen" Frequenz von ca. 100 min^{-1}. Weitergehende Druckschwankungen bzw. Sogspitzen waren bei schnellem Umschalten zwischen den Perifusionsmedien auf einem angeschlossenen Oszillografen nicht feststellbar.

3.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur Ausarbeitung der PDE-Bestimmung in kleinsten Gewebemengen (ca. 5 isolierte Langerhanssche Inseln)

3.2.1 ATP-Messung mit Luciferase-Reagenz A

Da in Veröffentlichungen über ATP-Messungen mit Luciferase verschiedene Zusammensetzungen für das Luciferase-Reagenz angegeben werden (37, 68, 84), wurde die Aktivität und Zeitstabilität mehrerer verschiedener Reagenzansätze untersucht. Die Kontrolle zeitlicher Aktivitätsänderungen war notwendig, da die Messung einer Versuchsserie von ca. 50 Proben $1\frac{1}{2}$ - 2 Stunden dauerte.

3.2.1.1 Benötigte Menge an gefriergetrockneter Luciferase

Die Enzymaktivität des Luciferase-Reagenz A (enthaltend 1 mg Luciferase / ml Reagenz, s. 2.4.3.3) war ausreichend, um mit dem verwendeten Lumineszenz-Photometer eine lineare Meßwertzunahme von o,2 pmol bis 2 nmol ATP (in 10 µl) zu erhalten. Übliche Versuchsergebnisse lagen im Bereich von 1 - 25 pmol / 10 µl. Der Blindwert des Luciferase-Reagenz A (Eigenlumineszenz durch Kontamination) entsprach ca. o,3 pmol ATP. Bei Einsatz von 5 mg Luciferase / ml Reagenz (übrige Zusammensetzung unverändert) war die Aktivität

etwa 7-fach, der Blindwert 5-fach gesteigert. Der höhere Enzymeinsatz brachte also keinen entsprechenden Vorteil.

3.2.1.2 Zusätze zum Luciferase-Reagenz A

Luciferase wurde (1 mg/ml) in MPS-Puffer gelöst. Zu Anteilen wurden sofort noch 5 mg bzw. 10 mg Rinderserumalbumin und / oder o,3 mg bzw. 1 mg Dithiothreit bzw. 3 mg Natriumarsenat je ml zugesetzt; weiter wurde entsprechend der Vorschrift für Luciferase-Reagenz A (2.4.3.3) verfahren. Nach verschiedenen Zeiten wurden ATP-Standardproben von jeweils 2 pmol/10 µl mit allen Luciferase-Ansätzen gemessen.

Es ergaben sich unterschiedliche Aktivitäten der Reagenzansätze, vor allem aber eine mehr oder weniger ausgeprägte Aktivitätssteigerung innerhalb 10 Stunden nach dem Lösen. Diese konnte weder auf Mikroorganismenbefall zurückgeführt werden (im Ansatz mit o,3 mg Dithiothreit + 5 mg Albumin je ml war erst nach 3 Tagen im "Brutschrank" bei 25° C ein schwacher Befall durch bewegliche stäbchenförmige begeißelte Bakterien festzustellen), noch auf etwaige Viskositätsänderungen und unterschiedliche Mischungsgeschwindigkeiten beim Injizieren der Proben. Allerdings wurden die Ansätze mit o,3 mg Dithiothreit + 5 mg Albumin (mit und ohne Natriumarsenat), und viel stärker die mit 1 mg Dithiothreit + 10 mg Albumin,

ab etwa 10 Stunden erst opalisierend, dann zunehmend getrübt, und nach 30 Stunden zunehmend viskoser; ein Hinweis auf biochemische Veränderungen.

Verwendet wurde als Luciferase-Reagenz A schließlich der Ansatz mit 5 mg Albumin / ml, der innerhalb der ersten 10 Stunden nach dem Lösen die am besten gleichbleibend hohe Aktivität aufwies (Abb. 5).

3.2.1.3 Hemmung der Luciferase durch Chlorid- und Ammonium-Ionen

Nach (68) wird die Luciferase-Reaktion durch Cl^- und NH_4^+ gehemmt. Da das verwendete Myokinase-Präparat Ammoniumsulfat enthält, zum anderen in einer Veröffentlichung über eine PDE-Bestimmung ein Inkubationspuffer von o,1 M Triäthanolamin-HCl angegeben wird, und in derselben Untersuchung bei Benutzung eines Myokinase-Präparates in gleichfalls 3,2 M Ammoniumsulfat abschließend vor der ATP-Messung mittels Luciferase noch mit einem Puffer von pH 9,5 verdünnt wird, wurde die Hemmung der Luciferase durch Cl^- - und NH_4^+ -Ionen bei verschiedenen pH - Werten von pH 8-9,5 untersucht.
Dazu wurde Kaliumchlorid bzw. Ammoniumsulfat in ATP - Standards (2 pmol / 10 µl) zugesetzt, der pH nötigenfalls nachgestellt, und die Meßwerte mit reinen ATP-Standards (beim selben pH) verglichen.

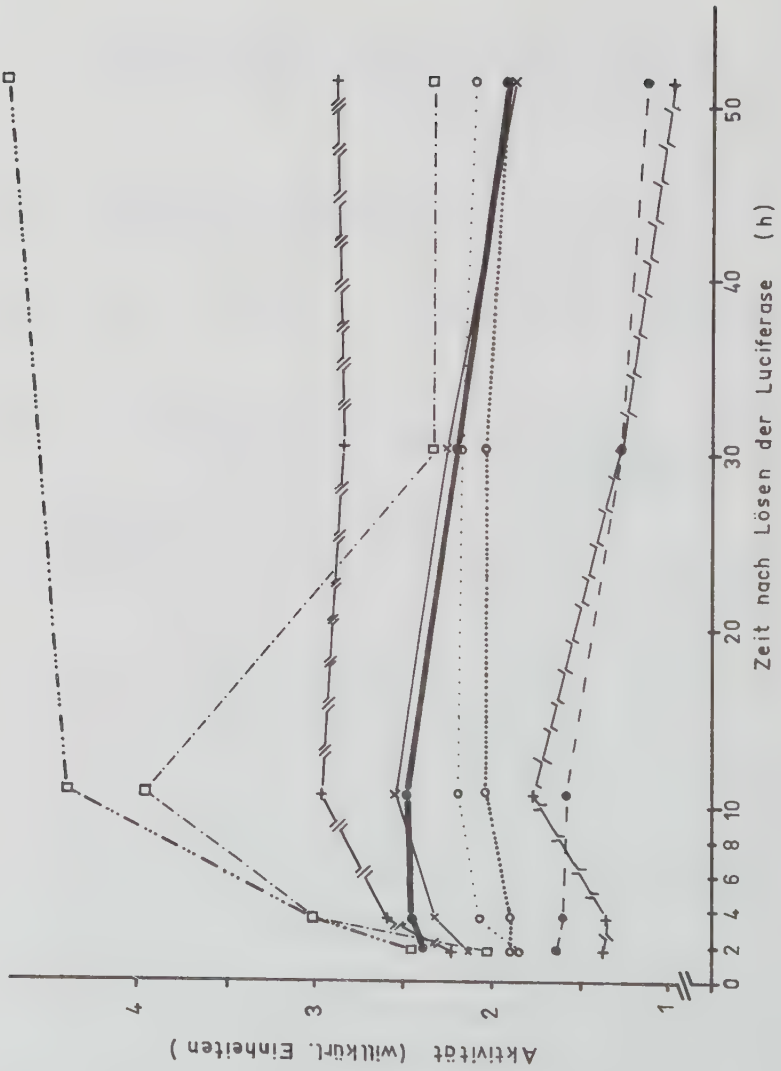


Abb. 5 (Legende nebenstehend)

Abb. 5: (Seite 58): Stabilität von Luciferase-Reagenz A bei verschiedenen Zusätzen.

Die Stabilität wurde überprüft durch Vergleich der Meßwerte (für jeweils 2 pmol ATP) bei allen Reagenzansätzen zu verschiedenen Zeiten nach deren Herstellung. Die Aktivität ≙ Lumineszenz-Meßwert ist angegeben in willkürlichen Einheiten; Mittelwerte aus 3 (2) getrennten Experimenten. (DTT = Dithiothreit)

Bei verschiedenen Luciferase-Ansätzen (Luciferase 1 mg/ml allein, mit 5 mg/ml Albumin, bzw. mit o,3 mg DTT + 5 mg Albumin + 3 mg Natriumarsenat je ml) ergab die schwache Hemmung durch 18 mM Ammoniumsulfat (entsprechend etwa der durch das Myokinasepräparat ins Reaktionsmedium eingebrachten Ammoniumsulfat-Menge) keine meßbaren Vorteile zugunsten eines der drei Luciferase-Ansätze; ebenso die Hemmung durch 50 mM Chlorid.

Für Luciferase-Reagenz A ergab sich, bei 2 pmol ATP gemessen:

durch 50 mM Cl^-	eine	mittl.	Hemmung	um	12 %
100 mM Cl^-	"	"	"	"	33 %
durch 18 mM NH_4^+ (pH 8,o)	"	"	"	"	3 %
50 mM NH_4^+ (pH 8,o)	"	"	"	"	7 %
" (pH 8,5)	"	"	"	"	8 %
" (pH 9,o)	"	"	"	"	13 %
" (pH 9,5)	"	"	"	"	46 %

(Mittelwerte von Dreifach- bzw. Doppelbestimmungen)

Die Verwendung eines Reaktionsmediums für die PDE-Bestimmung mit Zusatz von Triäthanolamin-HCl-Puffer (14), Ammoniumsalzen (84), oder stärker alkalischen Puffern zur Stabilitätserhöhung des ATP (14) wurde daher vermieden.

3.2.2 ATP-Messung mit Luciferase-Reagenz B

3.2.2.1 Benötigte Menge Luciferase bzw. Luciferin

Das in etwa nach Empfehlungen der Lieferfirma zusammengesetzte Luciferase-Reagenz B besaß mindestens gleichwertige Aktivität wie Luciferase-Reagenz A und ergab ebenfalls linear steigende Meßwerte von o,5 bis 200 pmol ATP. Einsatz der 3-fachen Menge Luciferin bzw. der 5-fachen Menge Luciferase ergab 3-fache bzw. 10-fache Steigerung der Lumineszenzausbeute, war für die Größenordnung der zu messenden ATP-Werte aber nicht erforderlich.

3.2.2.2 Stabilitätserhöhung des Luciferase-Reagenz B

Das ursprünglich ohne Dithiothreitzusatz hergestellte Luciferase-Reagenz (folgend in etwa Empfehlungen der Herstellerfirma der Substanzen) war wenig stabil: innerhalb $2\,^1/_2$ Stunden nahm die Aktivität um 50 % ab. Da die Messung einer üblichen Versuchsserie etwa $1\,^1/_2$ - 2 Stunden dauerte, war jedoch eine mindestens gleichlange konstant bleibende Reagenzaktivität erforderlich.
Erfolgreich war der wie bei Luciferase-Reagenz A versuchte Zusatz von o,3 mg Dithiothreit / ml: die Aktivität war nicht meßbar verringert, blieb aber über $4\,^1/_2$ Stunden konstant (Abb. 6).

3.2.3 Versuche zur Inkubation II
(Phosphorylierung des AMP zu ATP)

Von AMP - Standards wurden Verdünnungsreihen in Puffer I hergestellt. Zu jeweils 175 µl, enthaltend 0 , 25 , 50 , oder 100 pmol AMP, wurden 25 µl Reagenz II (2.4.3.2) zugesetzt, unter verschiedenen Bedingungen bei 37^{o} C im Wasserbad inkubiert und die Ausbeute an ATP gemessen.

Untersucht wurden die Einflüsse von:

- verschiedenen Mengen Myokinase, Pyruvatkinase
- Reaktions - pH: pH 7,5 bzw. 8,o
- Zusatz von 12,5 mM Dithiothreit

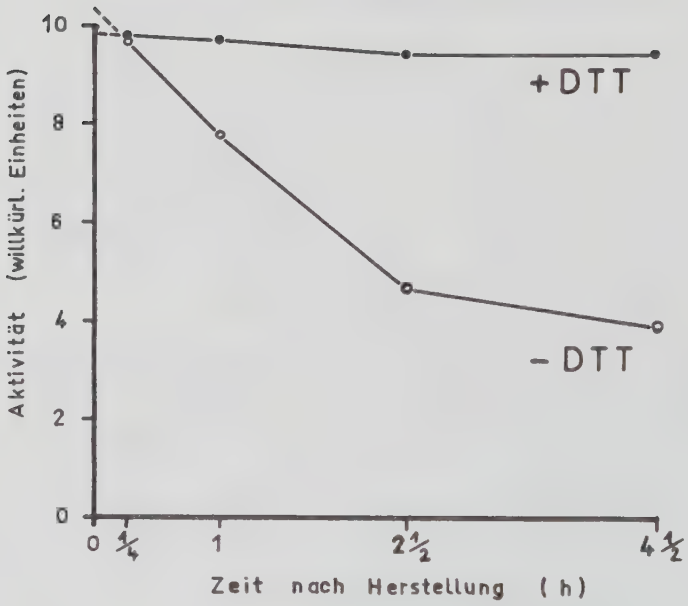


Abb. 6: Stabilität von Luciferase-Reagenz B .

Die Zeitstabilität beider Ansätze (ohne bzw. mit Zusatz von o,3 mg Dithiothreit (= DTT) je ml, wie später allg. verwendet) wurde überprüft durch Messung von jeweils 10 pmol ATP mit beiden Reagenzansätzen zu verschiedenen Zeiten nach deren Herstellung.
Die Aktivität ≙ Lumineszenz-Meßwert ist angegeben in willkürlichen Einheiten; Mittelwerte (n = 2).

- Inkubationsdauer 45 min - 120 min
- Inkubation im Schüttelbad
- verschiedener ATP - Vorgabe

Bei den anfänglichen 45-minütigen Inkubationen zeigte sich, vor allem bei fehlender oder geringer (o,6 pmol je Ansatz) ATP-Vorgabe, daß die Ausbeuten besonders für kleinere AMP-Mengen ungenügend waren (z.B. unter 10 % bei 25 pmol und 50 pmol AMP, bis 78 % bei 200 pmol AMP).
Die Konzentrationen der Nucleotide liegen bei den geringen Mengen im Ansatz (100 pmol $\triangleq 5 \cdot 10^{-7}$ M) weit unter den Michaeliskonstanten der Myokinase und Pyruvatkinase: in der Größenordnung von $5 \cdot 10^{-4}$ M (12).
Verbessert wurden die Ausbeuten durch Steigerung der Enzym-Mengen (von anfänglich o,18 U auf o,9 U Myokinase und o,1 U auf o,5 U Pyruvatkinase).
Keine wesentliche Verbesserung brachte der erhöhte Zusatz von 12,5 mM Dithiothreit (als Schutzreagenz für SH-Gruppen der Enzyme), Verringerung des pH-Werts auf 7,5 statt 8,o oder Reaktion im Schüttelbad.

Für die zum Beginn der Reaktionen:

$$AMP + ATP \xrightleftharpoons{\text{Myokinase}} 2\ ADP$$

$$ADP + PEP \xrightarrow[\not\leftarrow]{\text{Pyruvatkinase}} ATP + Pyruvat$$

notwendige ATP-Vorgabe

reichte offenbar, besonders bei kleineren AMP-Mengen, die stets vorhandene ATP-Kontamination nicht aus, um eine schnelle Umsetzung zu gewährleisten.

Tab. 3: Versuche zur Optimierung der Reaktionsbedingungen der Inkubation II. Jeweils 0, 25, 50, 100 bzw. 200 pmol AMP in Puffer I wurden eingesetzt und der zu ATP umgewandelte Anteil gemessen. Von der allg. Vorschrift (s. 2.8) abweichende Reaktionsbedingungen wie angegeben; Mittelwerte (n = 2-3).

Dauer der Inkubation	Enzym-Menge Myo-kinase	Pyruvat-kinase	bes.	ATP-Vorgabe	n	Ausbeute der Theorie für verschiedene AMP-Mengen: 25 pmol	50 pmol	100 pmol	200 pmol
45 min	0,18 U 0,45 U 0,90 U	0,1 U	---	0,6 pmol	2	0 2,5 %	0 1 % 8 %	55 %	11 % 68 % 78 %
45 min	0,9 U	0,1 U	---	0 pmol 1 pmol 10 pmol 50 pmol	2	8 % 17 % 41 % 90 %		78 % 80 % 90 % 97 %	
45 min	0,9 U	0,1 U	--- pH 7,5 Schüttelbad Reaktionsvol. 100 ul	10 pmol	3	79 % 88 % 72 % 87 %		77 % 82 % 80 % 93 %	
45 min	0,9 U	0,5 U	--- mit 12,5 mM DTT	10 pmol		86 % 83 %		87 % 81 %	
100 min	0,9 U	0,1 U	---	10 pmol	2	94 %		91 %	
120 min	0,36 U	0,2 U	---	0 pmol 2 pmol 5 pmol 10 pmol	3	16 % 83 % 88 % 98 %	69 % 95 % 106 % 103 %	101 % 99 % 100 % 103 %	
120 min	0,9 U	0,5 U	---	0 pmol 2 pmol 5 pmol 10 pmol	2	49 % 89 % 91 % 100 %	90 % 103 % 97 % 98 %	102 % 106 % 107 % 110 %	

Wesentlich bessere Ausbeuten wurden erzielt bei höherer Vorgabe von ATP (0, 2, 5, 10, sogar 50 pmol ATP); allerdings aufkosten eines entsprechend erhöhten Blindwerts.

Eine auch für kleinere AMP-Mengen ausreichende Ausbeute ($\geq$ 90 %) brachte schließlich die Verlängerung der Inkubationsdauer auf 120 min bei Vorgabe von 2 pmol ATP im Ansatz (Tab. 3).

3.2.4 Versuche zur AMP-Wiederfindung in Gegenwart von Inselhomogenat

Erste Versuche zur Bestimmung der PDE-Aktivität im Homogenat Langerhansscher Inseln ergaben paradoxerweise für steigende Mengen Inselhomogenat stark abfallende Meßwerte für die Phosphodiesteraseaktivität. Es wurde auf Vorhandensein AMP-abbauender Enzyme im Inselhomogenat geschlossen. Im Gegensatz dazu finden Ashcroft et al. (8) bei einer ähnlichen PDE-Bestimmung im Homogenat isolierter Inseln von Mäusen keinen störenden AMP-Abbau.
Zur Klärung wurden AMP-Wiederfindungsversuche durchgeführt; durch Zusatz von Nucleotiden, Nucleosiden oder Zuckerphosphaten im großen Überschuß gegenüber AMP wurde versucht, AMP-abbauende Enzyme zu "sättigen".
Jeweils 0, 25, 100 pmol AMP wurden im Puffer I ohne cAMP, sonst gleich der Inkubation I der PDE-Bestimmung, mit Inselhomogenat entsprechend 4,4 Inseln für 60 min bei 37° C

inkubiert. Danach wurde weiter wie bei der PDE-Bestimmung (s. 2.8) verfahren. Die AMP-Wiederfindung wurde verglichen mit Parallelansätzen, bei denen das AMP erst unmittelbar vor dem 4-minütigen Erhitzen im siedenden Wasserbad zugesetzt worden war. (Dabei wurden sowohl PDE wie auch die AMP-abbauenden Enzyme inaktiviert).

Zusammenfassung der Ergebnisse (s. Tab. 4):

(a) Nach 60 min Inkubation im Inselhomogenat ohne Zusätze betrug die Wiederfindung von 25 - 100 pmol AMP in allen Fällen weniger als 3%; schon bei nur 10 min Inkubation ergab sich eine um ca. 50 % verringerte Wiederfindung.

(b) Prüfung auf störende Deaminasen:

Es wurde versucht, eventuell in Inselhomogenat enthaltene desaminierende Enzyme durch Zusatz von Adenosin zu sättigen. In Versuchen mit o,o5 mM und o,5 mM Adenosin war die AMP-Wiederfindung max. 5 % ; bei sehr viel höheren Konzentrationen (10 mM Adenosin) allerdings stieg die AMP-Wiederfindung auf ca. 80 %.

(c) Prüfung auf störende unspezifische Phosphatasen:
Bei Zusatz von Zuckerphosphaten (je o,1 mM bzw. 1 mM Fructose-1,6-Diphosphat und Glucose-6-phosphat) lag die AMP-Wiederfindung im höchsten Einzelwert bei 11%.

(d) Prüfung auf störende 5'-Nucleotidasen:
Bei je 2 Versuchen mit Zusatz von IMP betrug die AMP-Wiederfindung mit o,1 mM IMP im Mittel ca. 45%, mit 1 mM IMP im Mittel ca. 70 % (25 pmol AMP) bzw.

Tab. 4: AMP-Wiederfindung in Gegenwart von Inselhomogenat bei verschiedenen Zusätzen.

Jeweils 25 pmol und 100 pmol AMP in Puffer I wurden mit Inselhomogenat (entsprechend 4,4 Inseln) 60 min bei 37° C inkubiert; weitere Zusätze wie angegeben.

Die AMP-Wiederfindung wurde berechnet durch Vergleich mit Parallelansätzen, die zur Inaktivierung der Enzyme sofort 4 min im siedenden Wasserbad erhitzt worden waren.

Bei $n < 3$ ist der Mittelwert $\pm$ SEM, sonst Einzelwerte angegeben.

Dauer der Inkubation	Zusätze	Wiederfindung von AMP für 25 pmol / 100 pmol	n
10 min	---	42 - 58 % / 46 - 61 %	2/2
60 min	---	0,8 $\pm$ 0,4 % / 1,0 $\pm$ 0,5 %	
60 min	0,05 mM Adenosin	5 % / 2 %	1/1
"	0,5 mM "	3 % / 2 %	1/1
"	10 mM "	80 % / 79 %	1/1
60 min	0,1 mM Fructose-1,6-diphosph.	< 1 %	2/2
"	1 mM "	< 1 %	2/2
60 min	0,1 mM Glucose-6-phosphat	4 - 11 % / 1 - 3 %	2/2
"	1 mM "	4 - 8 % / 1 %	2/2
60 min	0,1 mM IMP	16 - 63 % / 38 - 56 %	2/2
"	1,0 mM IMP	64 - 74 % / 71 - 110 %	2/2
60 min	0,1 mM GMP	53 $\pm$ 7,7 % / 52 $\pm$ 2,6 %	3/4
"	0,25 mM GMP	90 $\pm$ 5,4 % / 87 $\pm$ 1,5 %	7/14
"	1,0 mM GMP	94 $\pm$ 3,2 % / 94 $\pm$ 1,1 %	14/15

ca. 90 % (100 pmol AMP).
Bei Zusatz von GMP betrug die AMP-Wiederfindung im Mittel mit o,1 mM GMP ca. 52 %; mit o,25 mM GMP ca. 87 % ; mit 1 mM GMP ca. 94 %. (Ergebnisse von späteren Perifusionsversuchen miteingerechnet)

Der Abbau von AMP durch Inselhomogenat wurde demnach vor allem auf 5'-Nucleotidasen zurückgeführt.
Die PDE-Bestimmung in Inselhomogenat wurde daher stets unter Zusatz von o,25 mM GMP durchgeführt (in einigen Vorversuchen 1 mM GMP).

3.2.5 Versuche zur PDE-Bestimmung in Inselhomogenat

Diese Vorversuche wurden mit Homogenat frisch isolierter oder vorinkubierter Langerhansscher Inseln durchgeführt.

3.2.5.1 Lineare Abhängigkeit von der Gewebemenge

Bei 10 µM cAMP als Substrat wurde die PDE-Aktivität in jeweils 88 µl, 44 µl, 22 µl, und 0 µl Inselhomogenat in 2 unabhängigen Versuchen bestimmt; 88 µl Homogenat entsprach 4,4 bzw. 5 Inseln (jeweils Doppelbestimmung). Die gemessene PDE-Aktivität nahm linear mit der eingesetzten Gewebemenge zu; der Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden betrug o,999 bzw. o,991.
Ebenso ergab sich bei 1 µM und o,5 µM cAMP eine lineare

Zunahme der gemessenen PDE-Aktivität mit steigendem Einsatz an Inselhomogenat (entsprechend 0; 1,1; 2,2; 3,3; und 4,4 Inseln): Korrelationskoeffizient o,968 bzw. o,986.

3.2.5.2 Zeitlinearität

Die Zeitlinearität der PDE-Reaktion wurde geprüft durch Messung des gebildeten AMP nach 0, 15, 30, 60, und 120 bzw. 90 min. In 2 unabhängigen Versuchsreihen mit 10 µM cAMP als Substrat (und Homogenat entsprechend 4,4 bzw. 4,1 Inseln) blieb die Reaktion über 120 min verhältnismäßig linear: Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden o,994 bzw. o,996.
Bei 1 µM cAMP als Substrat blieb die Reaktion 90 min lang linear ($r = o,993$), bei o,5 µM cAMP im Reaktionsansatz 60 min lang ($r = o,991$); jeweils Dreifachbestimmungen.

Dabei wurden in der Reaktion von der eingesetzten Substratmenge (cAMP) umgesetzt:

bei 10 µM cAMP / 120 min: $\leqslant$ 13 %
bei 1 µM cAMP / 90 min: $\leqslant$ 42 %
bei o,5 µM cAMP / 60 min: $\leqslant$ 38 %

3.3 Ergebnisse der Untersuchungen zur DNA-Bestimmung in Langerhansschen Inseln

3.3.1 Vergleich mit der Methode nach Beckmann (10, 11)

Frisch isolierte Langerhanssche Inseln wurden möglichst gleichmäßig in zwei Gruppen geteilt:

- die Inseln der ersten Gruppe wurden in Anteilen von 5, 10, 20 Inseln (in jeweils 50 µl Hanks' Lösung mit o,8 mg Glucose / ml) in Reaktionsgefäße gezählt und der DNA-Gehalt wurde bestimmt entsprechend (10,11).

- die Inseln der zweiten Gruppe wurden gezählt, ± trockengesaugt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, gefriergetrocknet und ultraschallhomogenisiert entsprechend der üblichen Bereitung der Inselhomogenate (zum dierkten Vergleich ebenfalls in Hanks' Lösung mit o,8 mg Glucose je ml).

Die Meßwerte der DNA-Bestimmung in beiden Gruppen waren vergleichbar: der mittlere DNA-Gehalt pro Insel betrug

- bestimmt in ganzen Inseln: 35,6 ± 1,9 ng (n = 29)
- bestimmt in Inselhomogenat: 31,6 ± o,84 ng (n = 28)

(Mittelwerte ± SEM)

3.3.2 DNA-Wiederfindung in Gegenwart von Inselhomogenat

200 ng und 400 ng DNA wurden zu Inselhomogenat, entsprechend 5 bzw. 10 Inseln (in Hanks' Lösung ohne Glucose)

zugesetzt; der Gesamt-DNA-Gehalt wurde gemessen. Die DNA-Wiederfindung wurde als Differenz zwischen dem Meßwert für Inselhomogenat ohne bzw. mit DNA-Zusatz bestimmt. Sie betrug im Mittel aller Meßwerte 102,5 % (Tab. 5).
Die angegebenen Ergebnisse sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchsserien; die gewählten Mengen von 200 ng und 400 ng DNA liegen etwa in der Größenordnung des DNA-Gehalts von 5 bzw. 10 Inseln.

Tab. 5: Wiederfindungsrate von DNA in Gegenwart von Inselhomogenat

zugesetzte Menge an DNA	zu Homogenat entsprechend	Wiederfindungsrate in % ± SEM (n)
200 ng	5 Inseln	104,6 ± 1,2 (10)
200 ng	10 Inseln	105,9 ± 4,1 (10)
400 ng	5 Inseln	99,6 ± 1,o (8)
400 ng	10 Inseln	98,8 ± o,7 (8)

3.3.3 Prüfung auf Einflüsse der Perifusionszusätze

Da die angewandte DNA-Bestimmung nicht hoch spezifisch ist, wurde abgesichert, daß die Ergebnisse nicht etwa (eventuell über Veränderungen im Metabolismus) durch die Zusätze der Perifusionsversuche beeinflußt wurden.

Langerhanssche Inseln wurden entsprechend den späteren Perifusionsversuchen nach 40 min Vorperifusion jeweils 30 min mit Medium enthaltend 3 mg Glucose / ml oder weiter mit o,8 mg Glucose / ml perifundiert. Die anschließende DNA-Bestimmung ergab keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen: 30,9 ± 2,7 ng gegenüber 30,o ± 2,9 ng DNA-Gehalt je Insel (Mittelwerte ± SEM; jeweils n = 11).

Nach Durchführung der Perifusionsexperimente wurden die DNA-Meßwerte der Kontrollen verglichen mit denjenigen der Inseln, die in der Hauptperifusion den untersuchten Substanzen (Glucose, Insulin, Diamid) ausgesetzt worden waren. Es wurden keine Veränderungen festgestellt (Tab. 6).

Tab. 6: Vergleich der DNA-Meßwerte für Inseln nach Kontrollperifusionen und nach Hauptperifusionen.

Zusatz zur Hauptperifusion	DNA-Gehalt je Insel		Prüfung auf Signifikanz (t-Test)
	Kontrolle	Hauptperifusion	
Glucose 3 mg/ml	30,8 ± 1,8 (17)	31,7 ± 1,4 (32)	n.s.
Glucose 3 mg/ml + Insulin 800 µU/ml	27,9 ± 2,o (12)	28,4 ± 2,o (25)	n.s.
Glucose 3 mg/ml + Diamid o,1 mM	25,5 ± 2,8 (5)	28,1 ± 2,o (16)	n.s.

3.3.4 Kritik der Bestimmungsmethode

Die verwendete DNA-Bestimmungsmethode nach Beckmann (10) verzichtet auf die in der ursprünglichen Vorschrift (42) angegebenen aufwendigen und zusätzliche Fehlerquellen bietenden Extraktionsschritte: Trichloressigsäure-Fällung und Entfernung säurelöslicher Begleitstoffe, danach mehrfache Extraktion mit absolutem Äthanol bzw. äthanolischer Kaliumacetatlösung zur Entfernung von Lipiden, die ebenfalls fluoreszierende Reaktionsprodukte liefern. Allerdings erhöht schon ein nicht frisch destilliertes Äthanol selbst durch Aldehyd-Verunreinigungen leicht die Fluoreszenz-Blindwerte und trägt zu Fehlern bei (10).
Die verwendete Methode erwies sich nach Beckmann (10) wie nach den eigenen Überprüfungen als gut geeignet zur Bestimmung des DNA-Gehalts als Bezugsgröße in Langerhansschen Inseln. Bei Anwendung für andere Gewebe muß die Störanfälligkeit jeweils überprüft werden.

Es wurde gefunden, daß Glucose den Fluoreszenz-Blindwert konzentrationsabhängig erhöht: zwar entsprach der Fluoreszenzwert für 100 µg Glucose nur ca. 0,3 µg DNA, doch ergab dies für 50 µl Medium mit z.B. 3 mg Glucose/ml im Ansatz bereits einen Blindwert in derselben Höhe wie 450 ng DNA, entsprechend mehr als 10 Langerhansschen Inseln.
Bei Verwendung von Glucose enthaltendem Medium im DNA-Bestimmungsansatz (dies wurde in der Messung der Perifusionsversuche der vorliegenden Arbeit vermieden) muß also auf exakt gleiche Volumina geachtet werden.

4. VERSUCHSERGEBNISSE

4.1 Versuche mit nicht perifundierten Inseln

4.1.1 PDE - Formen in Langerhansschen Inseln

Um die verwendete PDE-Bestimmungsmethode zu überprüfen sowie auch, um geeignete cAMP-Konzentrationen für die Messung der PDE-Aktivität im Homogenat Langerhansscher Inseln herauszufinden, wurden die scheinbaren Michaelis-Konstanten und Maximalgeschwindigkeiten von low-K_m und high-K_m Phosphodiesterasen ermittelt.

4.1.1.1 Michaelis-Konstanten, Maximalgeschwindigkeiten

Die Umsatzgeschwindigkeiten bei verschiedenen Konzentrationen von cAMP (von 0,25 µM bis 500 µM) wurden in der Form v gegen $\frac{v}{(S)}$ aufgetragen (Diagramm nach Hofstee (13)). Es ergab sich ein kurvilinearer Verlauf, ein Hinweis auf die Anwesenheit zweier Enzymformen. Die Achsenschnittpunkte der beiden angenäherten Geraden dienten zur Ermittlung der Michaelis-Konstanten und Maximalgeschwindigkeiten (Abb. 7).

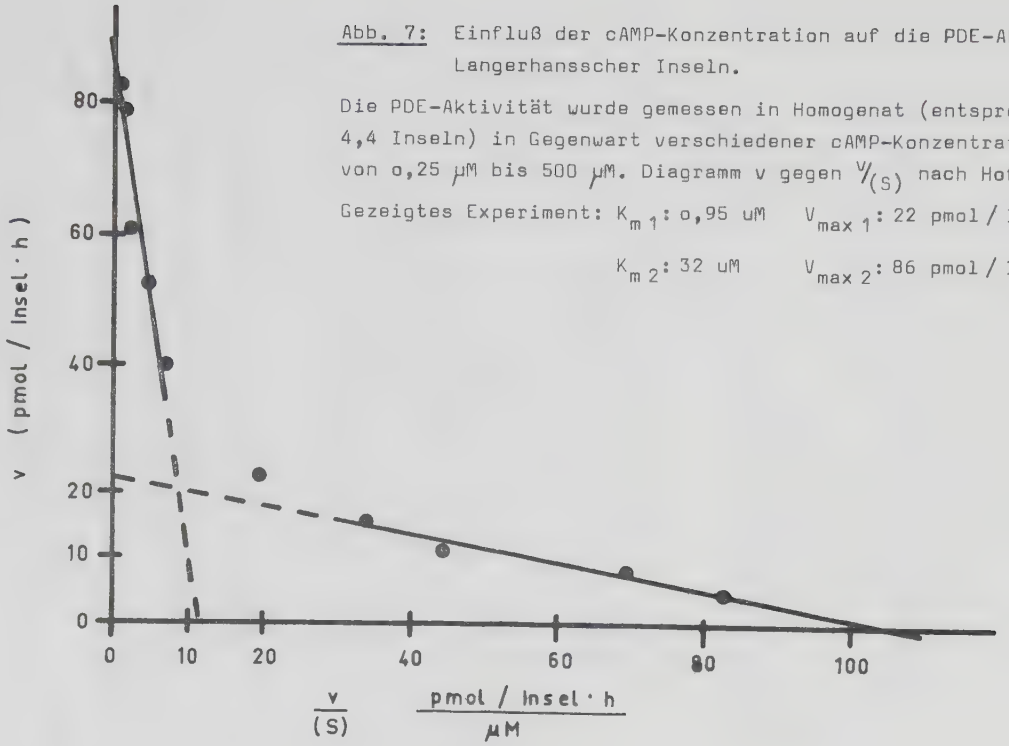


Abb. 7: Einfluß der cAMP-Konzentration auf die PDE-Aktivität Langerhansscher Inseln.

Die PDE-Aktivität wurde gemessen in Homogenat (entsprechend 4,4 Inseln) in Gegenwart verschiedener cAMP-Konzentrationen von 0,25 µM bis 500 µM. Diagramm v gegen $^{v}/_{(S)}$ nach Hofstee (13).

Gezeigtes Experiment: $K_{m\,1}$: 0,95 uM $V_{max\,1}$: 22 pmol / Insel · h

$K_{m\,2}$: 32 uM $V_{max\,2}$: 86 pmol / Insel · h

Die erhaltenen Werte der beiden Michaelis-Konstanten aus 3 Versuchen betrugen im Mittel 1,2 μM und 39 μM für frisch isolierte, sofort homogenisierte Inseln. Mittelwerte der Maximalgeschwindigkeiten V_{max} waren 23 und 103 pmol/Insel·h. Für tiefgefrorene, gefriergetrocknete und in allen Schritten gleich behandelte Inseln wie zur PDE-Bestimmung nach Perifusionsexperimenten (3.3.4) ergaben sich ähnliche Mittelwerte für $K_{m\,app}$ und V_{max} : 1,3 μM und 46 μM für low-K_m und high-K_m PDE beziehungsweise 23 und 122 pmol je Insel · h.

4.1.1.2 $K_{m\,app}$ und V_{max} in Gegenwart von EGTA

Auch in Gegenwart von 1 mM EGTA (mit Zusatz von 0,8 mM $MgSO_4$, um die Konzentration an Mg^{++}-Ionen im Ansatz konstant zu halten) ergaben sich ähnliche Werte der Michaelis-Konstanten und Maximalgeschwindigkeiten im Homogenat frisch isolierter wie gefriergetrockneter Inseln.

Die Maximalgeschwindigkeit der high-K_m PDE war durch den Zusatz von 1 mM EGTA verringert (94 pmol/Insel·h in frisch isolierten Inseln; 108 pmol/Insel·h in gefriergetrockneten Inseln), während die Michaelis-Konstante erhöht war (48 μM in frisch isolierten Inseln, 56 μM in gefriergetrockneten Inseln).

Die erhaltenen Mittelwerte für $K_{m\,app}$ und V_{max} der low-K_m

PDE waren bei EGTA-Zusatz etwas verringert: 1,1 µM bzw. 1,o µM; und 19 bzw. 17 pmol/Insel·h für frisch isolierte bzw. gefriergetrocknete Inseln

4.1.2 Versuche zum Nachweis von Calmodulin im Homogenat Langerhansscher Inseln

4.1.2.1 Einfluß von Inselextrakt auf calmodulinabhängige Phosphodiesterase

Zur Inaktivierung der inseleigenen PDE wurde das Homogenat frisch isolierter und vorinkubierter Inseln (200 Inseln /1,o ml Puffer I) im siedenden Wasserbad 6 min erhitzt. Calmodulin übersteht unzerstört mehrminütiges Erhitzen im siedenden Wasserbad (71,75). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 10 min bei 6500 g zentrifugiert; Aliquots des klaren Überstandes wurden zu einer aktivatorabhängigen PDE-Präparation aus Meerschweinchenhirn (2.4.3.7) zugesetzt und deren Aktivität in Gegenwart von 10 µM cAMP und 1 mM Ca^{++} bestimmt.
Der erhitzte Inselextrakt zeigte in Aliquots entsprechend o,44 ; 2,2 ; und 8,8 Inseln keine meßbare PDE-Aktivität mehr, erhöhte jedoch die Aktivität der calmodulinabhängigen PDE-Präparation dosisabhängig um ca. 15 % , 60 % , und 120 % (Abb. 8).

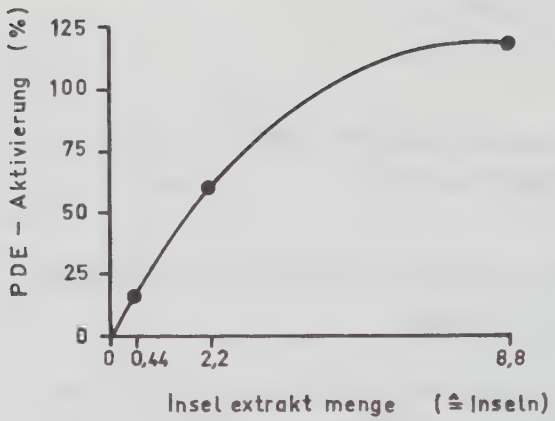


Abb. 8: Einfluß von Inselextrakt auf eine calmodulin-abhängige PDE-Präparation aus Meerschweinchenhirn.

44 µl - Aliquots des 6 min im siedenden Wasserbad erhitzten Inselextrakts (ohne eigene PDE-Aktivität) wurden mit 44 µl aktivatorabhängiger PDE in Gegenwart von 10 µM cAMP und 1 mM $CaCl_2$ inkubiert.
Die Erhöhung der PDE-Aktivität bei Zusatz von Inselextrakt ist bezogen auf die unstimulierte Aktivität ≙ 100 %.
Mittelwerte aus 2 getrennten Versuchen.

4.1.2.1.1 Einfluß von Trifluoperazin

Die durch Inselextrakt bewirkte Aktivierung der calmodulinabhängigen PDE-Präparation konnte durch 25 µM Trifluoperazin, einen Hemmstoff für Calmodulin (47), im Mittel um 80 % gehemmt werden (Tab. 7).

Tab. 7: Einfluß von 25 µM Trifluoperazin auf die Aktivierung der calmodulinabhängigen PDE durch erhitzten Inselextrakt.
Die Aktivität der calmodulinabhängigen PDE (44 µl) wurde gemessen in Gegenwart von 10 µM cAMP und 1 mM $CaCl_2$ mit 44 µl Puffer I oder (44 µl) steigenden Mengen des erhitzten Inselextrakts, jeweils mit und ohne Zusatz von 25 µM Trifluoperazin.
Die Erhöhung der PDE-Aktivität in Gegenwart von Inselextrakt ist bezogen auf die unstimulierte PDE-Aktivität ≙ 100 % (Mittelwerte, n = 2).

Aliquots des Inselextrakts entsprechen	- - -	25 µM Trifluoperazin	
	Aktivierung der calmodulinabhg. PDE	Restaktivierg.	Hemmung der Aktivierung
2,2 Inseln	40 %	8,5 %	80 %
4,4 Inseln	65 %	6 %	90 %
8,8 Inseln	92 %	23 %	75 %

4.1.3 Versuche zum Nachweis von Calmodulin · Ca^{++} - abhängiger PDE in Langerhansschen Inseln

4.1.3.1 Einfluß von Calmodulin auf die PDE-Aktivität im Homogenat Langerhansscher Inseln

Um zu untersuchen, ob das Homogenat Langerhansscher Inseln calmodulinabhängige PDE enthält, wurde geprüft, ob sich die PDE-Aktivität durch Zusatz von Calmodulin erhöhen läßt. Das war jedoch nicht der Fall:
In 2 getrennten Versuchsserien wurde zu Aliquots vom Homogenat frisch isolierter Inseln Calmodulin aus Meerschweinchenhirn zugesetzt (in derselben Menge von 100 ng Protein, die bei einer aktivatorabhängigen PDE-Präparation eine Aktivierung von 306 % bewirkten - s. 2.4.3.7, Abb. 1).
Die PDE-Aktivität des Inselhomogenats, gemessen in Anwesenheit von 10 uM cAMP und o,2 mM Ca^{++} , wurde durch Calmodulin nicht verändert:
34,1 ± o,77 pmol/Insel·h gegenüber 34,6 ± o,75 pmol/Insel·h
(Mittelwerte ± SEM; jeweils n = 11. Vergl. auch Tab. 8).

4.1.3.2 Einfluß von Trifluoperazin

Nachdem durch zugesetztes Calmodulin die PDE-Aktivität in Inselhomogenat nicht erhöht werden konnte, wurde untersucht, ob Hemmstoffe der Calmodulin · Ca^{++} -Aktivierung auch die in Inselhomogenat gemessene PDE-Aktivität verrin-

gern. In Tab. 8 ist der Einfluß von 25 µM Trifluoperazin auf die Gesamt-PDE-Aktivität in Inselhomogenat mit und ohne Zusatz von Calmodulin zusammengefaßt.
Zusatz von 25 µM Trifluoperazin führte zu einer signifikanten Verminderung der bei 10 µM cAMP gemessenen Gesamt-PDE-Aktivität Langerhansscher Inseln von 34,6 auf 28,9 pmol/Insel·h; das entspricht einer Hemmung um 17%. (Allerdings wurde auch eine calmodulinabhängige PDE-Präparation selbst, ohne Aktiviatorzusatz, durch 25 µM Trifluoperazin um ca. 8,6% -nicht signifikant- gehemmt: s. 2.4.3.7).

Aussagekräftiger ist der Befund, daß die Hemmung der Insel-PDE-Aktivität durch Trifluoperazin bei Anwesenheit zusätzlichen Calmodulins teilweise wiederaufgehoben wurde: die Erhöhung von 28,9 auf 32,1 pmol/Insel·h war signifikant (Tab. 8).

Tab. 8: Einfluß von Trifluoperazin auf die Gesamt-PDE-Aktivität in Inselhomogenat.

Die PDE-Aktivität in Homogenat frisch isolierter Inseln (44 µl entsprechend 4,4 Inseln) wurde gemessen mit oder ohne Calmodulin-Zusatz (44 µl Calmodulin-Präparation ≙ 100 ng Protein); mit oder ohne Zusatz von 25 µM Trifluoperazin; 10 µM cAMP; o,2 mM Ca^{++}.
Mittelwerte ± SEM; jeweils n = 11.

	PDE - Aktivität (in pmol/Insel · h)		Signifikanz nach t-Test
	-----	25 µM Trifluop.	
	A	B	
Inselhomogenat	34,6 ± o,75	28,9 ± o,91	A vs B: $p < o,oo1$
			A vs C: n.s.
Inselhomogenat	C	D	B vs D: $p < o,o1$
+ Calmodulin	34,14 ± o,77	32,07 ± o,62	C vs D: $p < o,o5$

4.1.3.3 Einfluß von EGTA

Anders als Trifluoperazin, welches das Aktivatorprotein Calmodulin in Anwesenheit von Ca^{++} bindet und dadurch eine PDE-Aktivierung hemmt (47), verhindert EGTA die Aktivierung der PDE durch Komplexierung der erforderlichen Ca^{++} - Ionen (25).
Tab. 9 zeigt den Einfluß von 1 mM EGTA auf die Aktivität der PDE Langerhansscher Inseln, gemessen in Gegenwart von

1 µM bzw. 10 µM cAMP, und o,2 mM Ca^{++}.
Die bei 10 µM cAMP gemessene Gesamt-PDE-Aktivität wurde durch Zusatz von 1 mM EGTA signifikant um ca. 24 % gehemmt (von 29,3 auf 22,2 pmol / Insel · h). In Gegenwart von 1 µM cAMP wurde die PDE-Aktivität durch 1 mM EGTA nur schwach beeinflußt (7,25 auf 6,7 pmol/Insel · h).

Tab. 9: Einfluß von 1 mM EGTA auf die PDE-Aktivität in Homogenat Langerhansscher Inseln.

Die PDE-Aktivität wurde in Aliquots entsprechend 4,4 Inseln bestimmt in Gegenwart von 1 µM bzw. 10 µM cAMP, und o,2 mM Ca^{++}; jeweils mit oder ohne Zusatz von 1 mM EGTA (plus o,8 mM $MgSO_4$, um komplex gebundenes Mg^{++} zu ersetzen und die Konzentration an Mg^{++} im Ansatz konstant zu halten). Mittelwerte ± SEM (n)

cAMP-Konzentration	PDE-Aktivität (in pmol/Insel · h)		Signifikanz nach t-Test
	- - - -	1 mM EGTA	
1 µM	7,25 ± o,56 (6)	6,70 ± o,46 (6)	n. s.
10 µM	29,3 ± 1,20 (16)	22,2 ± o,775 (16)	p o,oo1

4.2 Perifusionsversuche

4.2.1 Glucose-induzierte Insulinsekretion

Untersuchungen an perifundierten Langerhansschen Inseln haben hauptsächlich 2 Vorteile gegenüber solchen Versuchen, in denen isolierte Inseln für bestimmte Zeit in verschiedenen Medien inkubiert werden und danach die angesammelte Menge oder die erreichte Größe bestimmter Substanzen, Metaboliten oder Parameter gemessen wird:

(a) es können zeitliche Veränderungen und Abläufe bestimmt werden;

(b) es können Rückkopplungsmechanismen durch im Medium angesammelte Stoffe, z.B. eine Rückkopplungshemmung durch angesammeltes sezerniertes Insulin, vermieden werden.

So ist auch der Einfluß definierter Insulinkonzentrationen auf isolierte Langerhanssche Inseln am besten in Perifusionsversuchen zu bestimme.

Allerdings bestehen mehr Risiken einer unphysiologischen Beeinflussung, wie z.B. durch zu hohen oder zu niederen Druck innerhalb der Perifusionskammern, ja sogar durch Adsorption des Insulins an die Innenwandung der Perifusionsschläuche (36), welche durch Zusatz von Albumin im Medium vermieden wird.

Um die Funktion der aufgebauten Perifusionsanordnung zu

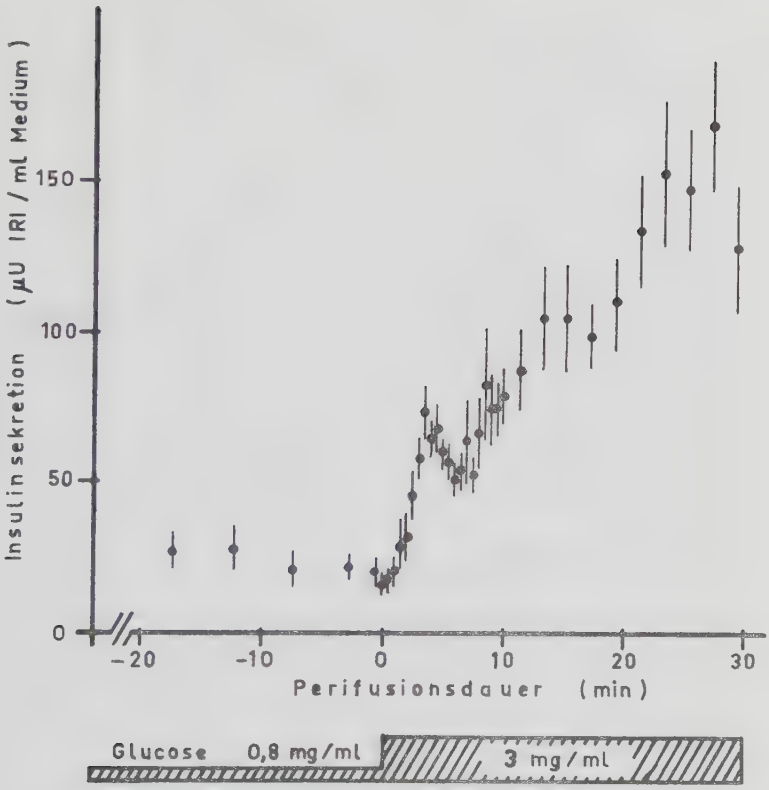


Abb. 9: Insulinsekretionskurve Langerhansscher Inseln bei Perifusion mit Glucose (3 mg/ml).

Jeweils 50 Inseln wurden perifundiert. Nach einer 40-min. Vorperifusionsphase (Glucose 0,8 mg/ml) wurde zum Zeitpunkt 0 auf Medium mit 3 mg Glucose / ml umgeschaltet. Mittelwerte ± SEM, n = 9 - 12.

4.2 Perifusionsversuche

4.2.1 Glucose-induzierte Insulinsekretion

Untersuchungen an perifundierten Langerhansschen Inseln haben hauptsächlich 2 Vorteile gegenüber solchen Versuchen, in denen isolierte Inseln für bestimmte Zeit in verschiedenen Medien inkubiert werden und danach die angesammelte Menge oder die erreichte Größe bestimmter Substanzen, Metaboliten oder Parameter gemessen wird:

(a) es können zeitliche Veränderungen und Abläufe bestimmt werden;

(b) es können Rückkopplungsmechanismen durch im Medium angesammelte Stoffe, z.B. eine Rückkopplungshemmung durch angesammeltes sezerniertes Insulin, vermieden werden.

So ist auch der Einfluß definierter Insulinkonzentrationen auf isolierte Langerhanssche Inseln am besten in Perifusionsversuchen zu bestimme.

Allerdings bestehen mehr Risiken einer unphysiologischen Beeinflussung, wie z.B. durch zu hohen oder zu niederen Druck innerhalb der Perifusionskammern, ja sogar durch Adsorption des Insulins an die Innenwandung der Perifusionsschläuche (36), welche durch Zusatz von Albumin im Medium vermieden wird.

Um die Funktion der aufgebauten Perifusionsanordnung zu

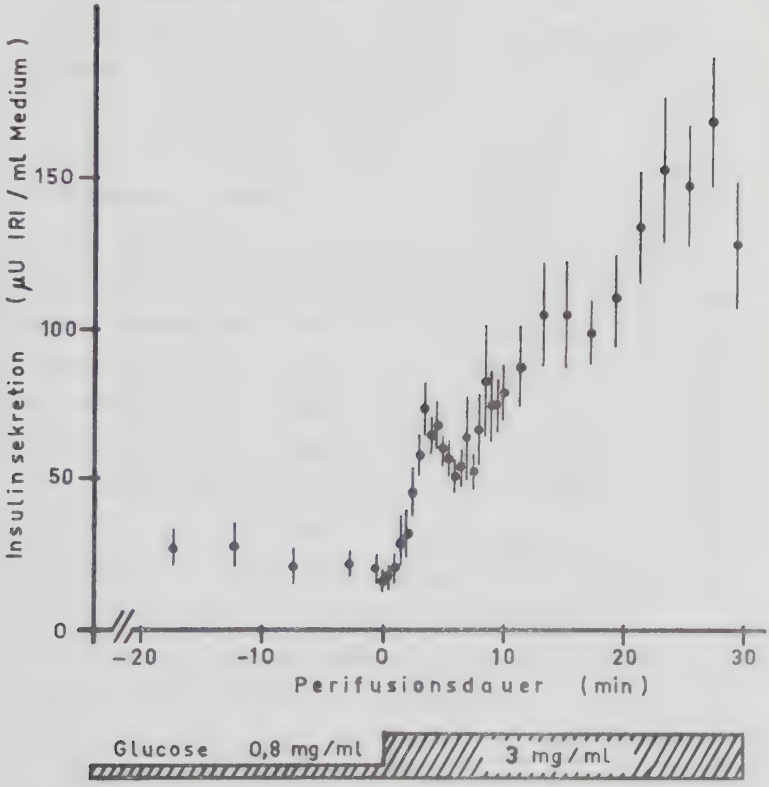


Abb. 9: Insulinsekretionskurve Langerhansscher Inseln bei Perifusion mit Glucose (3 mg/ml).

Jeweils 50 Inseln wurden perifundiert. Nach einer 40-min. Vorperifusionsphase (Glucose 0,8 mg/ml) wurde zum Zeitpunkt 0 auf Medium mit 3 mg Glucose / ml umgeschaltet. Mittelwerte ± SEM, n = 9 - 12.

überprüfen, wurde die Insulinsekretionskurve perifundierter Langerhansscher Inseln bestimmt. Abb. 9 zeigt den Verlauf der Insulinsekretion bei Stimulierung mit Glucose (3 mg/ml); jeweils 50 isolierte Inseln wurden perifundiert.
Während einer 40-minütigen Vorperifusionsphase (o,8 mg Glucose / ml im Medium) erreichte die "basale" Insulinsekretion konstante Ausgangswerte von ca. 20 µU/ml im Perifusionsmedium. Die glucosestimulierte Insulinsekretion zeigt einen biphasischen Verlauf mit einem ersten Gipfelwert von ca. 75 µU/ml im aufgefangenen Perifusionsmedium 3 min nach Zusatz der stimulierenden Glucosekonzentration, mit einer Absenkung auf ca. 50 µU/ml nach 6 min und einer stetigen Zunahme auf ca. 170 µU/ml während der 30-minütigen Perifusionsdauer.
Eine qualitativ und quantitativ sehr ähnliche Insulinsekretionskurve Langerhansscher Inseln bei Perifusion mit Glucose (3 mg/ml) wird von Lipson et al. (50) angegeben.

4.2.2 PDE-Aktivität nach Perifusion mit Glucose

Da die Stimulierung der Insulinsekretion Langerhansscher Inseln durch Glucose mit einer Erhöhung des zellulären cAMP-Gehalts einhergeht, sollte in einem ersten Teil der Perifusionsversuche untersucht werden, ob sich nach Perifusion mit Glucose eine Veränderung der PDE-Aktivität

der Langerhansschen Inseln feststellen läßt.

Tab. 10 zeigt zusammengefaßt die unter verschiedenen Bedingungen gemessene PDE-Aktivität Langerhansscher Inseln nach Perifusion mit Glucose (3 mg/ml).

In einer ersten Serie von Experimenten wurde die PDE-Aktivität gemessen in Gegenwart von 10 µM cAMP mit oder ohne Zusatz von 25 µM Trifluoperazin, um etwaige Veränderungen der Gesamt-PDE-Aktivität und der nicht-aktivatorabhängigen (low-K_m) PDE zu ermitteln.

Trifluoperazin führte in allen Proben zu einer gleich starken Verringerung der PDE-Aktivität um ca. 12 %; die mit oder ohne Trifluoperazin-Zusatz gemessene PDE-Aktivität war durch Glucose (3 mg/ml) nach keinem Perifusionsintervall signifikant verändert.

Als zusätzliche Kontrolle wurden Gruppen von 50 Inseln parallel zur Hauptperifusion auch über die gesamte Perifusionsdauer (40 min Vor- und 30 min Hauptperifusion) nur mit Vorperifusionsmedium (0,8 mg Glucose / ml) perifundiert. Auch in diesen Inseln war die PDE-Aktivität, gemessen bei 10 µM cAMP, weder gegenüber den gleichlange mit 3 mg Glucose / ml perifundierten Inseln noch gegenüber den Kontrollen (0 min Hauptperifusion) signifikant verändert: Die mit bzw. ohne Zusatz von Trifluoperazin gemessene PDE-Aktivität betrug, ausgedrückt in pmol/h • ng DNA:

Kontrolle (0 min Hauptperif.): 0,778 ± 0,057 bzw. 0,717 ± 0,058
Kontrolle (30 min Hauptperif.): 0,685 ± 0,069 bzw. 0,590 ± 0,072
Glucosestimulierte Inseln
(30 min Hauptperif.): 0,782 ± 0,079 bzw. 0,699 ± 0,085

(Mittelwerte ± SEM; jeweils n = 5)

Tab. 10: Einfluß von Glucose (3 mg/ml) auf die PDE-Aktivität perifundierter Langerhansscher Inseln.

Jeweils 50 isolierte Inseln wurden perifundiert in Gegenwart von 3 mg Glucose / ml für 0 min (= Kontrolle), 3 min, 6 min und 30 min nach einer gemeinsamen Vorperifusionsperiode von 40 min (mit 0,8 mg Glucose / ml).
Die PDE-Aktivität wurde bestimmt im Inselhomogenat (≙ 4,4 Inseln) in Gegenwart von 1 µM und 10 µM cAMP; in einer Versuchsserie mit oder ohne Zusatz von 25 µM Trifluoperazin.
Die Meßwerte sind bezogen auf den DNA-Gehalt der Proben; Mittelwerte ± SEM (n).

⊠: $p < 0{,}02$; alle anderen Meßwerte nicht signifikant verschieden von den Kontrollen.

PDE-Bestimmung mit:	Perifusionsdauer			
	0 min	3 min	6 min	30 min
	pmol cAMP / h · ng DNA			
1 µM cAMP	0,271 ± 0,009 (7)	0,240 ± 0,006 ⊠ (7)	0,257 ± 0,011 (6)	0,279 ± 0,014 (7)
10 µM cAMP	0,813 ± 0,032 (12)	0,789 ± 0,026 (12)	0,809 ± 0,036 (11)	0,803 ± 0,032 (12)
10 µM cAMP + 25 µM Trifluoperazin	0,717 ± 0,058 (5)	0,721 ± 0,065 (5)	0,714 ± 0,069 (5)	0,699 ± 0,085 (5)

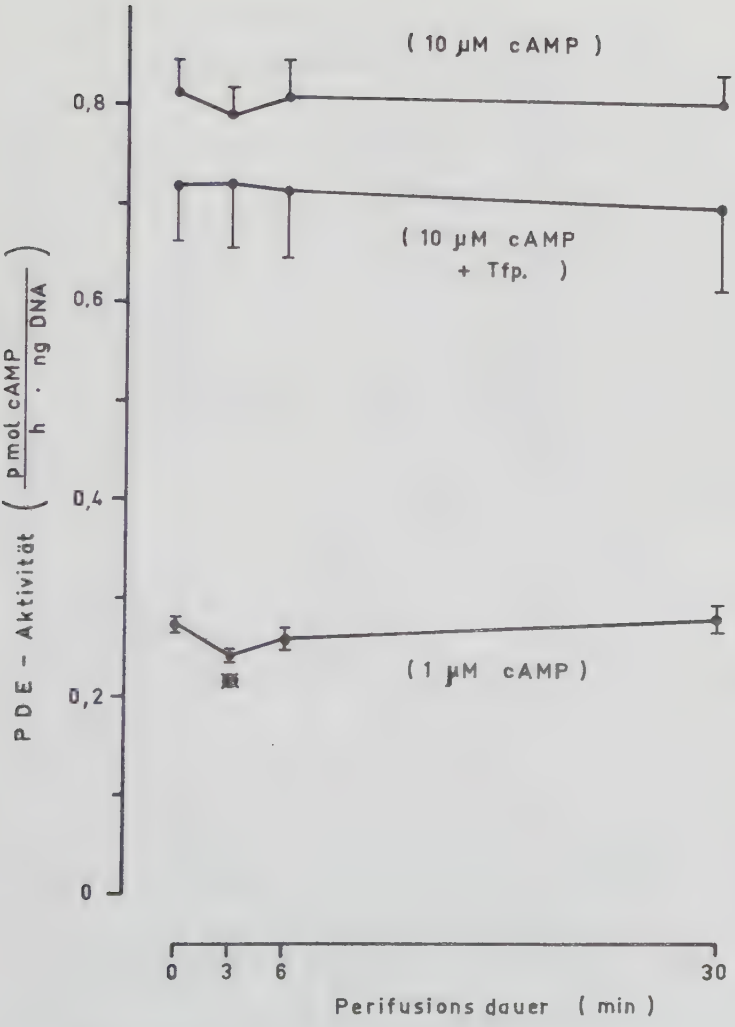


Abb. 10: Einfluß von Glucose (3 mg/ml) auf die PDE-Aktivität perifundierter Langerhansscher Inseln. (Erläuterungen: siehe Tab. 10)

In den folgenden Experimenten wurde die PDE-Aktivität ohne Zusatz von Trifluoperazin in Gegenwart von 1 µM und 10 µM cAMP bestimmt.
Bei der Messung mit 10 µM cAMP wurden wie in der ersten Versuchsserie keine Veränderungen der Gesamt-PDE-Aktivität nach Perifusion mit Glucose (3 mg/ml) festgestellt. Die in Gegenwart von 1 µM cAMP gemessene PDE-Aktivität jedoch war in den Langerhansschen Inseln nach 3 min Perifusion mit Glucose, also zum Zeitpunkt des ersten Gipfels der Insulinsekretion, signifikant um ca. 11% verringert; allerdings nicht mehr nach den anderen Perifusionsintervallen von 6 min oder 30 min.

4.2.3 PDE-Aktivität nach Perifusion mit Glucose + Insulin

In diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob exogenes Insulin die PDE-Aktivität perifundierter Langerhansscher Inseln beeinflußt, da bei Einwirkung von Insulin auf intakte Fett- und Leberzellen eine Aktivierung der low-K_m PDE gefunden wurde (44, 51, 53, 59, 67).
Wie Tab. 11 und Abb. 11 zeigen, wurde die PDE-Aktivität Langerhansscher Inseln, gemessen in Gegenwart von 1 µM wie von 10 µM cAMP, durch Perifusion mit Glucose (3 mg/ml) plus exogenem Insulin (800 µU/ml) weder nach 3, 6, noch 30 min signifikant verändert.

Tab. 11: Einfluß von Glucose (3 mg/ml) plus exogenem Insulin (800 uU/ml) auf die PDE-Aktivität perifundierter Langerhansscher Inseln.

Jeweils 50 Inseln wurden perifundiert in Gegenwart von Glucose + exogenem Insulin für 0 min (= Kontrolle), 3 min, 6 min und 30 min nach einer gemeinsamen Vorperifusionsperiode von 40 min (mit Glucose 0,8 mg/ml).
Die PDE-Aktivität wurde bestimmt im Inselhomogenat (≙ 4,4 Inseln) in Gegenwart von 1 µM und 10 µM cAMP. Die Meßwerte sind bezogen auf den DNA-Gehalt der Proben.
Mittelwerte ± SEM (n).

PDE-Bestimmung mit:	Perifusionsdauer			
	0 min	3 min	6 min	30 min
	pmol cAMP / h • ng DNA			
1 µM cAMP	0,272 ± 0,022 (6)	0,263 ± 0,038 (4)	0,250 ± 0,032 (4)	0,257 ± 0,030 (5)
10 µM cAMP	0,825 ± 0,050 (8)	0,754 ± 0,071 (6)	0,740 ± 0,070 (4)	0,763 ± 0,053 (7)

Statistische Auswertung:
Alle Meßwerte nicht signifikant verschieden von den Kontrollen (0 min).

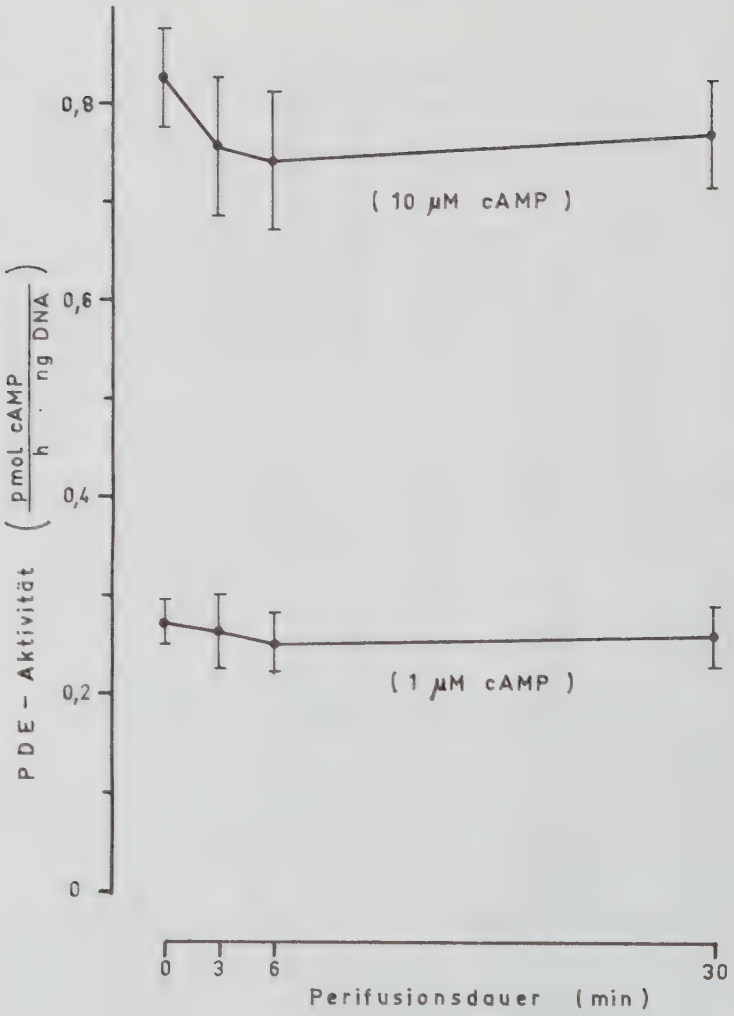


Abb. 11: Einfluß von Glucose (3 mg/ml) plus exogenem Insulin (800 µU/ml) auf die PDE-Aktivität perifundierter Langerhansscher Inseln. (Erläuterungen: siehe Tab. 11)

Andererseits war - bei allerdings größeren Streuungen - die nach 3 min Perifusion mit Glucose (3 mg/ml) allein beobachtete Hemmung der PDE-Aktivität (bei 1 µM cAMP) nicht mehr nachweisbar.

4.2.4 PDE-Aktivität nach Perifusion mit Glucose + Diamid

Da in unserem Labor gezeigt werden konnte, daß bei Zusatz von o,1 mM Diamid zum Inkubationsmedium die durch Glucose (3 mg/ml) hervorgerufene Erhöhung des cAMP-Gehalts Langerhansscher Inseln vermindert ist (34), sollte untersucht werden, ob diese Verminderung des cAMP-Gehalts mit einer Erhöhung der PDE-Aktivität einhergeht. Um der Beantwortung dieser Frage näherzukommen, wurden in einer Versuchsserie jeweils 50 Langerhanssche Inseln mit Medium, dem o,1 mM Diamid und 3 mg Glucose / ml zugesetzt waren, perifundiert und nach 0, 3, 6 und 30 min Perifusionsdauer die PDE-Aktivität bestimmt.
Wie Tab. 12 und Abb. 12 zeigen, hatte o,1 mM Diamid in Anwesenheit von Glucose (3 mg/ml) keinen Effekt auf die PDE-Aktivität perifundierter Langerhansscher Inseln. Allerdings war auch hier - bei ebenfalls größeren Streuungen - die nach 3 min Perifusion mit Glucose (3 mg/ml) allein beobachtete Hemmung der (bei 1 µM cAMP gemessenen) PDE-Aktivität nicht mehr nachweisbar.

Tab. 12: Einfluß von Glucose (3 mg/ml) plus Diamid (o,1 mM) auf die PDE-Aktivität perifundierter Langerhansscher Inseln.

Jeweils 50 Inseln wurden perifundiert in Gegenwart von 3 mg Glucose / ml plus o,1 mM Diamid für 0 min (≙ Kontrolle), 3 min, 6 min und 30 min nach einer gemeinsamen Vorperifusionsperiode von 40 min (mit o,8 mg Glucose / ml).
Die PDE-Aktivität wurde bestimmt im Inselhomogenat (≙ 4,4 Inseln) in Gegenwart von 1 µM und 10 µM cAMP. Die Meßwerte sind bezogen auf den DNA-Gehalt der Proben.
Mittelwerte ± SEM (n).

PDE-Bestimmung mit:	Perifusionsdauer			
	0 min	3 min	6 min	30 min
	pmol cAMP / h • ng DNA			
1 µM cAMP	o,321 ± o,o27 (5)	o,31o ± o,o28 (5)	o,285 ± o,o19 (5)	o,295 ± o,o2o (6)
10 µM cAMP	o,896 ± o,o77 (5)	o,884 ± o,o81 (5)	o,865 ± o,o78 (5)	o,871 ± o,o58 (6)

Statistische Auswertung:
Alle Meßwerte nicht signifikant verschieden von den Kontrollen (0 min).

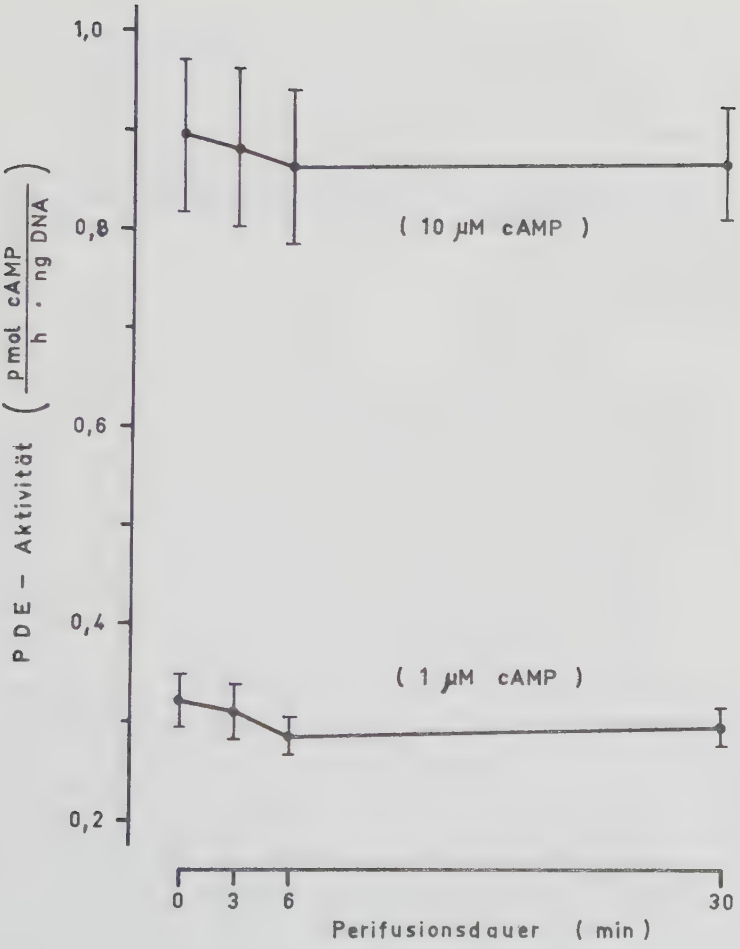


Abb. 12: Einfluß von Glucose (3 mg/ml) plus Diamid (0,1 mM) auf die PDE-Aktivität perifundierter Langerhansscher Inseln.
(Erläuterungen: siehe Tab. 12)

Zuvor war in einer Untersuchung sichergestellt worden, daß o,1 mM Diamid, im Gegensatz zu höheren Konzentrationen wie o,25 mM und 1 mM, nicht den ATP-Gehalt Langerhansscher Inseln verringert (4). Diese Vorraussetzung muß erfüllt sein, da ATP in jedem Fall zur physiologischen Insulinsekretion notwendig ist.

5. DISKUSSION

5.1 PDE-Formen und Calmodulin in Langerhansschen Inseln

5.1.1 High-K_m und low-K_m PDE

Wie eingangs angedeutet ergeben die Untersuchungen der letzten Zeit über Anzahl und Eigenschaften verschiedener PDE-Formen aus Säugetiergeweben ein zunehmend komplizierteres Bild. Obwohl nicht geklärt ist, wieviele der identifizierten PDE-Formen auch in intakten Zellen vorkommen und welche Eigenschaften sie im System intakter Zellen besitzen, wird heute allgemein die Existenz zweier PDE-Hauptformen in den meisten Säugetierzellen angenommen (85). Da sich ihre Michaelis-Konstanten für die Hydrolyse von cAMP um 1 - 2 Größenordnungen unterscheiden, werden sie high-K_m bzw. low-K_m PDE bezeichnet.
K_m - Werte von ca. 30 - 180 µM bzw. nahe 1 µM werden angegeben für high-K_m und low-K_m PDE aus Fettgewebe, Gehirn, Herz, Leber, Niere, Pancreas (18, 35, 62, 67, 72); ähnliche Werte sind auch bei Untersuchungen Langerhansscher Inseln für beide Enzyme gefunden worden: 30 - 500 µM bzw. 3 - 10 µM (8, 17, 63).
In guter Übereinstimmung dazu stehen die Michaelis-Konstan-

ten für high-K_m und low-K_m PDE Langerhansscher Inseln, die in der vorliegenden Arbeit zur Kontrolle der Meßmethode bestimmt wurden: Werte der $K_{m\,app}$ von 39 µM bzw. 1,2 µM wurden ermittelt im Homogenat frisch isolierter Inseln, 1,3 µM und 46 µM im Homogenat tiefgefrorener, gefriergetrockneter und in allen Schritten gleichbehandelter Inseln wie bei den späteren Perifusionsexperimenten. Die Entsprechung der erhaltenen Werte der Michaelis-Konstanten (wie auch der Maximalgeschwindigkeiten sowohl bei Messung ohne als auch mit Zusatz von 1 mM EGTA, s. 4.1.1.1, 4.1.1.2) bei frisch isolierten wie "aufgearbeiteten" Inseln, und ihre Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur bestätigen die Anwendbarkeit der Methode zur PDE-Aktivitätsbestimmung wie zur Bereitung der Inselhomogenate.

5.1.2 Calmodulin

Als Hinweis auf das Vorhandensein von Calmodulin in Gewebsextrakten gilt die Ca^{++} -abhängige Aktivierung einer calmodulinabhängigen PDE-Präparation. Eine zusätzliche Bestätigung bedeutet es, wenn eine solche Aktivierung durch 25 µM Trifluoperazin, einen (in dieser Konzentration) spezifischen Hemmstoff von Calmodulin (47, 83) hemmbar ist.
Wie Abb. 8 zeigt, wurde eine calmodulinabhängige PDE-Präparation aus Meerschweinchenhirn in Anwesenheit von

1 mM Ca^{++} durch einen Inselextrakt konzentrationsabhängig aktiviert, und die Aktivierung wurde in Gegenwart von 25 µM Trifluoperazin um ca. 80 % (im Mittel) gehemmt (Tab. 7).

Während der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde auch fast gleichzeitig von anderen Autoren das Vorkommen von Calmodulin in Langerhansschen Inseln beschrieben (69, 74), sowie die Stimulierbarkeit einer Adenylat Cyclase-Form in Inseln durch Calmodulin · Ca^{++} (65, 69, 74).

Ob auch die high-K_m PDE in Inselzellen calmodulinabhängig ist, ist m.W. noch nicht untersucht.

5.1.3 Calmodulin · Ca^{++} - abhängige PDE

Wie Tab. 9 zeigt, wird die PDE-Aktivität in Inselhomogenat durch Komplexierung der Ca^{++}-Ionen mittels 1 mM EGTA bei 10 µM cAMP deutlich gehemmt, während bei 1 µM cAMP kein signifikanter Einfluß von 1 mM EGTA feststellbar ist. Diese Ergebnisse lassen auf eine Ca^{++}-Abhängigkeit wahrscheinlich der high-K_m PDE schließen.

Durch 25 µM Trifluoperazin wird die Gesamt-PDE-Aktivität in Inselhomogenat, gemessen in Gegenwart von 10 µM cAMP, ebenfalls signifikant gehemmt, wie Tab. 8 zeigt: ein Hinweis auf das gleichzeitige Vorhandensein von Calmodulin und calmodulinabhängiger PDE. Noch aussagekräftiger ist der Befund, daß die Trifluoperazin-Hemmung der PDE-

Aktivität in Inselhomogenat durch zugesetztes Calmodulin teilweise wiederaufgehoben werden kann (Tab. 8).
Daß durch zugesetztes Calmodulin die nicht gehemmte PDE-Aktivität nicht zusätzlich gesteigert wird (ebenfalls Tab. 8), bedeutet keinen Widerspruch zu den anderen Ergebnissen, sondern deutet darauf hin, daß das im Inselhomogenat enthaltene endogene Calmodulin bereits für maximale Stimulierung der PDE-Aktivität ausreicht.
Zusammengefaßt zeigen die Befunde an, daß auch in Langerhansschen Inseln wie in den meisten Säugetiergeweben sowohl beide PDE-Hauptformen als auch Calmodulin vorkommen und daß die high-K_m PDE in Inselzellen wie diejenige vieler anderer Säugetierzellarten durch endogenes Calmodulin $\cdot Ca^{++}$ aktiviert werden kann.
Ob die high-K_m PDE allerdings eine physiologische Bedeutung für die Regulation intrazellulärer cAMP-Spiegel oder eher für den Abbau von cGMP besitzt, ist noch ungeklärt (82). Für die letztere Möglichkeit wird als Argument angeführt, daß die Affinität der high-K_m PDE zu cGMP größer ist als zu cAMP (82).

5.2 Glucose und PDE-Aktivität

Nach Gewebekultur Langerhansscher Inseln über 6 Tage in einem Medium mit 3 mg Glucose / ml fanden Berne und Andersson (14) eine erhöhte Aktivität der low-K_m PDE in Inseln.

Dagegen wurden keine Veränderungen der Insel-PDE-Aktivität gemessen bei kurzzeitiger (5 min) Inkubation von 500 Inseln in Gegenwart von 3 mg Glucose / ml (17) oder bei Zugabe von Glucose in gleicher Konzentration zum PDE-Bestimmungsansatz (8, 17, 63).

Nach dem Nachweis der Calmodulin · Ca^{++} - aktivierbaren Adenylat Cyclase in Langerhansschen Inseln stellten Sugden et al. (69) sowie Sharp und Mitarb. (65) die folgende Hypothese zum Mechanismus des durch Glucose bewirkten vorübergehenden cAMP-Anstiegs in intakten Inselzellen auf:

Der in Gegenwart von Glucose beobachtete Anstieg der Ca^{++}-Konzentration bzw. der erhöhte Einstrom von Ca^{++} in Inseln könnte mittels Calmodulin erst die Aktivität der zellwandständigen Adenylat Cyclase stimulieren (→ erhöhte Bildung von cAMP) und weiter, nachdem vermehrt Ca^{++} ins Cytosol diffundiert, dort eine etwaige calmodulinabhängige high-K_m PDE aktivieren.

Da in vorliegender Arbeit gezeigt wurde, daß die high-K_m PDE in Langerhansschen Inseln durch Calmodulin · Ca^{++} aktiviert werden kann, könnte dieser Vorgang möglich sein.

Jedoch konnte in den Perifusionsexperimenten der vorliegenden Arbeit keine Erhöhung der PDE-Aktivität durch Glucose gefunden werden (Tab. 10 und Abb. 10). Dagegen wurde nach 3 min Perifusion mit Glucose (3 mg/ml) sogar eine schwache, jedoch signifikante Hemmung der PDE-Aktivität der Langerhansschen Inseln, bestimmt mit der niedrigeren cAMP-Konzentration, beobachtet (Tab. 10, Abb. 10).

Diese vorübergehende Hemmung fällt zeitlich zusammen mit dem höchsten cAMP-Anstieg in Inselzellen (34) sowie mit dem ersten Gipfelwert der Insulinsekretion bei Glucosestimulierung.
In Fettzellen wird die Aktivität der low-K_m PDE verringert durch S-S- Gruppen reduzierende Substanzen (43, 44). Entsprechend könnte die vorliegende Beobachtung im Einklang stehen mit früheren Untersuchungen unseres Labors, die zeigten, daß stimulierende Glucosekonzentrationen in den Zellen der Langerhansschen Inseln zu einem mehr reduzierten Redoxzustand führen, da durch Glucose der NADPH/NADP-Quotient (5) sowie der GSH-Gehalt (2) erhöht werden.

Versucht man, die physiologische Bedeutung der beobachteten schwachen und vorübergehenden Aktivitätsminderung der low-K_m PDE zu werten, so scheinen die vorliegenden Ergebnisse mit der folgenden Annahme übereinzustimmen, daß eher die Bildung von cAMP über eine Aktivierung der Adenylat Cyclase als ein verminderter Abbau durch Hemmung der PDE-Aktivität die Ursache des cAMP-Anstiegs in Langerhansschen Inseln bei Stimulation mit Glucose bildet.

5.3 Exogenes Insulin und PDE-Aktivität

In intakten Leber- und Fettzellen erhöht Insulin in vitro die Aktivität der low-K_m PDE (44, 51, 53, 58, 59, 67)

und hemmt die Lipolyse und andere von cAMP als "second messenger" ausgelöste metabolische Wirkungen.
In isolierten Langerhansschen Inseln wurden nach Inkubation mit exogenem Insulin verschiedene metabolische Veränderungen gemessen, wie z.B. eine Verringerung des NADPH/NADP - Quotienten und der PPS-Aktivität (6) sowie der intrazellulären GSH-Spiegel (2, 30). Gleichzeitig mit diesen Veränderungen wird die durch Glucose induzierte Insulinsekretion vermindert (6).
Anders als bei Leber- und Fettzellen zeigten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit jedoch keinen Einfluß von exogenem Insulin auf die low-K_m PDE Langerhansscher Inseln (Tab. 11 und Abb. 11). Übereinstimmend ergaben frühere Untersuchungen auch keine Veränderung des intrazellulären cAMP-Spiegels bei Inkubation (2,5 min) isolierter Inseln mit derselben Konzentration von exogenem Insulin (800 µU/ml) in Anwesenheit von Glucose (3 mg/ml) (34).
Eine Deutung dieser unterschiedlichen Effekte in Inseln und Fett- bzw. Leberzellen könnte sich im Zusammenhang mit neuesten Untersuchungen ergeben, die zeigten, daß auch die kürzlich nachgewiesenen Insulinrezeptoren Langerhansscher Inseln (79) in ihren chemischen Eigenschaften bzw. Verhalten gegenüber biochemischen Veränderungen verschieden sind von den Insulinrezeptoren anderer Zellarten wie z.B. im Fettgewebe (77).

5.4 Diamid und PDE-Aktivität

Diamid war bereits in früheren Untersuchungen in unserem Labor als Oxidationsmittel für SH-Gruppen, besonders für GSH (45), eingesetzt worden.

Dabei wurde gezeigt, daß Diamid in derselben Konzentration von o,1 mM, wie in vorliegender Arbeit verwendet, in Langerhansschen Inseln die zellulären ATP-Spiegel nicht beeinflußt (4), jedoch den Gehalt an reduziertem GSH vermindert (30), den cAMP-Spiegel in Gegenwart von 3 mg Glucose / ml senkt (4) und ebenso die durch Glucose und p-Chlormercuribenzoat sowie Tolbutamid induzierte Insulinsekretion hemmt (1, 3).

Wie eingangs erwähnt, hatten Ergebnisse von Versuchen an isolierten Fettzellen auf die Bedeutung von S-S-Gruppen für die Aktivität der low-K_m PDE hingewiesen: die Enzymaktivität wurde verringert durch Dithiothreit, jedoch stabilisiert und aufrechterhalten in Gegenwart von SH-Oxidationsmitteln wie Iodoacetamid, $Na_2S_4O_6$, oder sogar H_2O_2 (43).

Daher wurde in einer Serie von Perifusionsversuchen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob o,1 mM Diamid in Gegenwart von Glucose, welche ja in Inseln zu einem mehr reduzierten Redoxzustand führt (2, 5), durch Oxidation von GSH eine Erhöhung der low-K_m PDE-Aktivität in Inseln bewirkt. Wie Tab. 12 und Abb. 12 zeigen, wurde jedoch keine Veränderung der PDE-Aktivität Langerhansscher Inseln in

Gegenwart von Diamid + Glucose festgestellt.
Ebenso wie das Ausbleiben einer Stimulierung der low-K_m PDE durch exogenes Insulin deuten diese Beobachtungen auf unterschiedliche Eigenschaften der low-K_m PDE in Inseln und Fett- bzw. Leberzellen hin.
Früher war gezeigt worden, daß dasselbe Agens (o,1 mM Diamid) die zellulären cAMP-Spiegel Langerhansscher Inseln ebenfalls nicht verändert bei Inkubation in Anwesenheit von nur 1 mg Glucose / ml (4). Jedoch bei Gegenwart von 3 mg Glucose / ml, in einer Situation einer vermutlichen Stimulierung der Adenylat Cyclase (34, 65, 69, 74), wurde der hervorgerufene cAMP-Anstieg durch Diamid verringert (4).
Zusammengefaßt lassen diese Ergebnisse darauf schließen, daß eher die Bildung von cAMP durch die Adenylat Cyclase als der cAMP-Abbau durch die PDE in Langerhansschen Inseln durch den intrazellulären Redoxzustand (beeinflußt z.B. durch Diamid) reguliert werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Langerhanssche Inseln besitzen sowohl high-K_m als auch low-K_m PDE. Allerdings ist noch wenig bekannt, ob auch die PDE-Formen in Inselzellen regulatorischen Einflüssen unterliegen vergleichbar denen, die z.B. in Fett- und Leberzellen gefunden wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es also, zu untersuchen,

1. ob das Ca^{++} - abhängige Aktivatorprotein Calmodulin in Langerhansschen Inseln vorkommt, und ob die high-K_m PDE in Inselzellen wie in den meisten der untersuchten Säugetierzellarten durch Calmodulin · Ca^{++} aktiviert werden kann.
2. Aus Befunden, die zeigen, daß Glucose zu einer Zunahme des cAMP-Gehalts in Inselzellen führt, ergab sich die Fragestellung, ob diese Wirkung über eine Stimulierung der Adenylat Cyclase oder eine Hemmung der PDE zustande kommt. Daher sollte der Einfluß von Glucose auf die PDE-Aktivität Langerhansscher Inseln untersucht werden.
3. In intakten Fett- und Leberzellen stimuliert Insulin in vitro die Aktivität der low-K_m PDE. Exogenes Insulin hemmt andererseits in Langerhansschen Inseln die Insulinsekretion. Daher sollte untersucht werden, ob ähnlich wie in Fett- und Leberzellen auch in Inseln exogenes Insulin zu einer Zunahme der low-K_m PDE-Aktivität führt.
4. Die Bedeutung des Redoxzustandes von S-S- bzw. SH-Gruppen für die Aktivität der low-K_m PDE hatten Unter-

suchungen in Fettzellen gezeigt. Daher sollte letztlich untersucht werden, ob Diamid (eine Substanz, die den Redoxzustand in Inselzellen durch Oxidation von GSH verändert) die Aktivität der PDE in Langerhansschen Inseln beeinflußt.

Ein wesentlicher methodischer Teil der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine der verschiedenen in der Literatur beschriebenen PDE-Bestimmungsmethoden so zu modifizieren, daß sie für die Bestimmung der PDE-Aktivität in kleinsten Gewebemengen, wie einer möglichst geringen Anzahl isolierter Langerhansscher Inseln (ca. 5 µg Trockengewicht), geeignet war.
Zum zweiten war eine vorhandene Methode zur DNA-Bestimmung für die Anwendung in vorliegender Arbeit zu modifizieren.

Schließlich war für die Versuche der vorliegenden Arbeit, zur Vermeidung von Rückwirkungen des sezernierten Insulins auf die untersuchten Inseln, eine bisher in unserem Arbeitskreis noch nicht vorhandene Perifusionsapparatur für isolierte Langerhanssche Inseln aufzubauen.

6.2 Schlußfolgerungen

1. In Übereinstimmung mit den meisten der untersuchten Säugetiergewebearten verfügen auch die Langerhansschen Inseln der Ratte neben low-K_m und high-K_m PDE über Calmodulin.
   Ebenso ist die high-K_m PDE durch Calmodulin aktivierbar.

2. Die vorübergehende schwache Hemmung der PDE-Aktivität (gemessen bei 1 μM cAMP) nach 3 min Perifusion mit Glucose (3 mg/ml) fällt zeitlich zusammen mit dem in anderen Untersuchungen gezeigten vorübergehenden cAMP-Anstieg in Inselzellen bei Glucosestimulierung sowie mit dem ersten Gipfelwert der Insulinsekretion.
   Wegen der geringen Änderung der PDE-Aktivität (11%) sollte jedoch die Frage nach einer physiologischen Relevanz offen bleiben.

3. Im Gegensatz zur low-K_m PDE von Fett- und Leberzellen scheint die low-K_m PDE in Langerhansschen Inseln durch exogenes Insulin nicht aktivierbar.

4. Während die Aktivität der low-K_m PDE in Fettzellenhomogenaten durch Reduktion von S-S-Gruppen verringert, durch SH-Gruppen oxidierende Substanzen dagegen aufrechterhalten und stabilisiert wird, scheint eine Erhöhung des zellulären Oxidationspotentials in Langerhansschen Inseln nicht mit einer Steigerung der Aktivität der low-K_m PDE einherzugehen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Niklas, H., Hegner, D.:
Inhibition of p-chloromercuribenzoate- and glucose-induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide, and tert-butyl hydroperoxide.
Mol. Pharmacol. 13, 598 - 605 (1977)

2. Ammon, H.P.T., Grimm, A., Lutz, S., Wagner-Teschner, D., Händel, M., Hagenloh, I.:
Islet glutathione and insulin release.
Diabetes (im Druck 1980)

3. Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Grimm, A., Niklas, H.:
Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH / GSSG ratios and tolbutamide mediated insulin release in vitro.
N.S. Arch. Pharmacol. 307, 91 - 96 (1979)

4. Ammon, H.P.T., Heinzl, S., Hagenloh, I.:
Effect of methylene blue and diamide on increases of cyclic AMP in rat pancreatic islets induced by glucose, glucagon, p-chloromercuribenzoate and aminophylline.
Mol. Pharmacol. (eingereicht zur Veröffentl. 1980)

5. Ammon, H.P.T., Hoppe, E., Akhtar, M.S., Niklas, H.:
Effect of leucine on the pyridine nucleotide contents and on the insulin released - Interactions in vitro with methylene blue, thiol oxidants, and p-chloromercuribenzoate.
Diabetes 28, 593 - 599 (1979)

6. Ammon, H.P.T., Verspohl, E.:
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology 99, 1469 - 1476 (1976)

7. Ammon, H.P.T., Verspohl, E.J., Händel, M.:
Relationship between specific binding of insulin to pancreatic islets and insulin induced inhibition of insulin secretion.
14 th Annual meeting of the EASD, Zagreb (1978)
Novo Service Nr. 10 (Abstract)

8. Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J., Täljedal, I-B.:
Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in normal mouse pancreatic islets.
FEBS Lett. 20, 263 - 266 (1972)

9. Beavo, J.A., Hardman, J.G., Sutherland, E.W.:
Hydrolysis of cyclic guanosine and adenosine 3',5'-monophosphates by rat and bovine tissues.
J. Biol. Chem. 245, 5649 - 5655 (1970)

10. Beckmann, J.:
An accurate and simple method for the determination of deoxyribonucleic acid.
N.S. Arch. Pharmacol. Suppl. 307, R 14 (1979)
(Abstract)

11. Beckmann, J.:
Arbeitsvorschrift zur DNA - Bestimmung in Langerhansschen Inseln.
Persönl. Mitteilung 1979

12. Bergmeyer, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., p. 518, 544
(3. Auflg. 1974)

13. Bergmeyer, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., p. 156
(3. Auflg. 1974)

14. Berne, C., Andersson, A.:
Long-term effects of a high glucose concentration
on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in
mouse pancreatic islets maintained in tissue culture.
Biochem. J. 156, 461 - 463 (1976)

15. Blackard, W.G., Kikuchi, M., Rabinovitch, A.,
Renold, A.E.:
An effect of hyposmolarity on insulin release
in vitro.
Am. J. Physiol. 228, 706 - 713 (1975)

16. Boudreau, R.J., Drummond, G.J.:
A modified assay of 3':5'-cyclic AMP phosphodiesterase.
Anal. Biochem. 63, 388 - 399 (1975)

17. Bowen, V., Lazarus, N.R.:
Glucose-mediated insulin release: 3',5' cAMP phospho-
diesterase.
Diabetes 22, 738 - 743 (1973)

18. Brostrom, C.O., Wolff, D.J.:
Calcium-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from brain: comparison of adenosine 3',5'-monophosphate as substrates.
Arch. Biochem. Biophys. 172, 301 - 311 (1976)

19. Burr, J.M., Balant, L., Stauffacher, W., Renold, A.E.:
Perifusion of rat pancreatic tissue in vitro: Substrate modification of theophylline-induced biphasic insulin release.
J. Clin. Invest. 49, 2097 - 2105 (1970)

20. Butcher, R.W., Sutherland, E.W.:
Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials.
J. Biol. Chem. 237, 1244 - 1250 (1962)

21. Cerasi, E.:
Mechanisms of glucose stimulated insulin secretion in health and diabetes: some re-evaluations and proposals.
Diabetologia 11, 1 - 13 (1975)

22. Charles, M.A., Lawecki, J., Pictet, R., Grodsky, G.M.:
Insulin secretion: Interrelationships of glucose, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate, and calcium.
J. Biol. Chem. 250, 6134 - 6140 (1975)

23. Cheung, W.Y.:
Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase: Demonstration of an activator.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 533 - 538 (1970)

24. Cheung, W.Y.:
Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation.
Science 207, 19 - 27 (1980)

25. Cheung, W.Y., Bradham, L.S., Lynch, Th.J., Lin, Y.M., Tallant, E.A.:
Protein activator of cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase of bovine or rat brain also activates its adenylate cyclase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 1055 - 1062 (1975)

26. Dedman, J.R., Means, A.R.:
Characterization of a spectrophotometric assay for cAMP phosphodiesterase.
J. Cycl. Nucl. Res. 3, 139 - 152 (1977)

27. DeLuca, M., McElroy, W.D.:
Purification and properties of firefly luciferase.
In: Methods in Enzymology, Vol. LVII.
Academic Press, New York, San Francisco, London.
p. 3 - 15 (1978)

28. Drummond, G.I., Perrott-Yee, S.:
Enzymatic hydrolysis of adenosine 3',5'-phosphoric acid.
J. Biol. Chem. 236, 1126 - 1129 (1961)

29. du Moulin, A.:
Untersuchungen zur Regulation der Aktivitäten von Phosphodiesterasen und der Adenylat Cyclase aus Hirngewebe.
Dissertation Tübingen, 1978

30. Grimm, A.:
Glutathion und Insulinsekretion. Mikromethoden zur Bestimmung von reduziertem und oxidiertem Glutathion in Langerhansschen Inseln. Beziehungen zwischen GSH / GSSG - Quotient und glucoseinduzierter Insulinsekretion.
Dissertation Tübingen, 1978

31. Gulyassy, P.F., Farrand, J.R.:
Comparison of batch and chromatographic assays of cyclic nucleotide phosphodiesterases.
J. Chromatogr. 129, 107 - 113 (1976)

32. Han, G.Y., Han, P.F., Owen, G.S., Johnson jr., J.:
A new method for measurement of cyclic AMP - phosphodiesterase activity.
J. Biochem. 82, 387 - 394 (1977)

33. Hanks, J.H., Wallace, R.E.:
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196 - 200 (1949)

34. Heinzl, S.:
Beziehungen zwischen den Redoxsystemen von NADPH/NADP und GSH/GSSG Langerhansscher Inseln und dem Stoffwechsel des cAMP.
Dissertation Tübingen 1979

35. Hidaka, H., Yamaki, T., Ochiai, Y., Asano, T., Yamabe, H.:
Cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase determined in various human tissues by DEAE-cellulose chromatography.
Biochim. Biophys. Acta 484, 398 - 407 (1977)

36. Idahl, L.A.:
A micro-perifusion device for pancreatic islets allowing concomitant recordings of intermediate metabolites and insulin release.
Anal. Biochem. 50, 386 - 398 (1972)

37. Johnson, R.A., Hardman, J.G., Broadus, A.E., Sutherland, E.W.:
Analysis of adenosine 3',5'-monophosphate with luciferase luminescence.
Anal. Biochem. 35, 91 - 97 (1970)

38. Kakiuchi, S., Yamazaki, R., Nakajima, H.:
Properties of a heat-stable phosphodiesterase activating factor isolated from brain extract.
Proc. Jap. Acad. 46, 587 - 592 (1970)

39. Kawazu, S., Kanazawa, Y., Ikeuchi, M., Hayashi, M., Kosaka, K.:
The dynamics of insulin release from monolayer-cultured pancreatic cells in a new perifusion system.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 156, 197 - 200 (1977)

40. Kikuchi, M., Rabinovitch, A., Blackard, W.G., Renold, A.E.:
Perifusion of pancreas fragments.
Diabetes 23, 550 - 558 (1974)

41. Kikuchi, M., Wollheim, C.B., Cuendet, G.S., Renold, A.E., Sharp, G.W.G.:
Studies on the dual effects of glucose on $^{45}Ca^{++}$ - efflux from isolated rat islets.
Endocrinology 102, 1339 - 1349 (1978)

42. Kissane, J.M., Robins, E.:
The fluorometric measurement of Deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous System.
J. Biol. Chem. 233, 184 - 188 (1958)

43. Kono, T., deBuschiazzo, P.M.:
Insulin-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase: Effects of salts and SH-modifiers.
Fed. Proc. 37, 1538 (1978) (Abstract)

44. Kono, T., Robinson, F.W., Sarver, J.A.:
Insulin-sensitive phosphodiesterase.
J. Biol. Chem. 250, 7826 - 7835 (1975)

45. Kosower, E.M., Correa, W., Kinon, B.J., Kosower, N.S.:
Glutathione VII. Differentiation among substrates by the thiol oxidizing agent, diamide.
Biochim. Biophys. Acta 264, 39 - 44 (1972)

46. Lacy, P.E., Kostianovsky, M.:
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35 - 39 (1967)

47. Levin, R.M., Weiss, B.:
Specificity of the binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of phosphodiesterase and to a series of other calcium-binding proteins.
Biochim. Biophys. Acta 540, 197 - 204 (1978)

48. Lin, Y.M., Liu, Y.P., Cheung, W.Y.:
Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase - Purification, characterization, and active form of the protein activator from bovine brain.
J. Biol. Chem. 249, 4943 - 4954 (1974)

49. Lipson, L.G., Sharp, G.W.G.:
Insulin release in pregnancy: Studies on adenylate cyclase, phosphodiesterase, protein kinase, and phosphoprotein phosphatase in isolated rat islets of Langerhans.
Endocrinology 103, 1272 - 1280 (1978)

50. Lipson, L.G., Siegel, E., Wollheim, C.B., Sharp, G.W.G.:
Insulin release during fasting: Studies on adenylate cyclase, phosphodiesterase, protein kinase, and phosphoprotein phosphatase in isolated islets of Langerhans of the rat.
Endocrinology 105, 702 - 707 (1979)

51. Loten, E.G., Assimapoulos-Jeannet, F.D., Exton, J.H., Park, Ch.R.:
Stimulation of a low K_m phosphodiesterase from liver by insulin and glucagon.
J. Biol. Chem. 253, 746 - 757 (1978)

52. Loten, E.G., Sneyd, J.G.T.:
An effect of insulin on adipose tissue adenosine 3':5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase.
Biochem. J. 120, 187 - 193 (1970)

53. Malbon, C.C., Fain, J.N.:
Insulin stimulation of particulate, low K_m adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity in fat cells of the obese-hyperglycaemic (ob/ob) mouse.
J. Cycl. Nucl. Res. 3, 315 - 323 (1977)

54. Montague, W.:
Cyclic nucleotides, Calcium and insulin secretion.
in: Cyclic 3',5'-nucleotides: Mechanisms of action.
(eds.: Cramer, H., Schultz, J.)
J. Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto,
p. 133 - 146 (1977)

55. Montague, W., Cook, J.R.:
The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release by isolated rat islets of Langerhans.
Biochem. J. 122, 115 - 120 (1971)

56. Niklas, H.:
Einfluss von Methylenblau, Diamid und t-Butylhydroperoxid auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhansschen Inseln des Rattenpankreas.
Ein Beitrag zur Erkennung der Bedeutung von NADPH und reduziertem Glutathion für den Sekretionsmechanismus.
Dissertation Tübingen 1978

57. Ong, K.K., Rennie, P.I.C.:
Assay errors of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase activity based on the recovery of adenosine alone using an anionic-exchange resin column.
Anal. Biochem. 76, 53 - 62 (1976)

58. Pawlson, L.G., Lovell-Smith, C.J., Manganiello, V.C., Vaughan, M.:
Effects of epinephrine, adrenocorticotrophic hormone, and theophylline on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity in fat cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1639 - 1642 (1974)

59. Phelps, B.H., Varandani, P.T.:
Stimulation by insulin of cyclic AMP phosphodiesterase. Role of Glutathione-insulin-transhydrogenase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 302 - 311 (1977)

60. Pöch, G.:
Assay of phosphodiesterase with radioactively labeled cyclic 3',5'-AMP as substrate.
N.S. Arch. Pharmacol. 268, 272 - 299 (1971)

61. Rabinovitch, A., Kikuchi, M., Gutzeit, A.H., Blackard, W.G., Renold, A.E.:
Hyposmolarita as a cause of insulin and glucagon "off - responses" in vitro.
Horm. Metab. Res. Suppl. Series 5 (Radioimmunoassay: Methodology and applications in physiology and in clinical studies), 44 - 49 (1974)

62. Robberecht, P., Deschodt-Lanckman, M., De Neef, P., Christophe, J.:
Hydrolysis of the cyclic 3':5'-monophosphates of adenosine and guanosine by rat pancreas.
Eur. J. Biochem. 41, 585 - 591 (1974)

63. Sams, D.J., Montague, W.:
The role of adenosine 3':5'-cyclic monphosphate in the regulation of insulin release.
Biochem. J. 129, 945 - 952 (1972)

64. Sharma, R.K., Wirch, E.:
Ca^{++} - dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from rabbit lung.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 338 - 344 (1979)

85. Sharp, G.W.G., Wiedenkeller, D.E., Kaelin, D., Siegel, E.G., Wollheim, C.B.:
Stimulation of adenylate cyclase by Ca^{2+} and calmodulin in rat islets of Langerhans. Explanation for the glucose-induced increase in cyclic AMP levels.
Diabetes 29, 74 - 77 (1980)

86. Soeldner, J.S., Slone, D.:
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique.
Diabetes 14, 771 - 779 (1965)

87. Solomon, S.S.:
Effect of insulin and lipolytic hormones on cyclic AMP phosphodiesterase activity in normal and diabetic rat adipose tissue.
Endocrinology 96, 1366 - 1373 (1975)

88. Stremler, B.L.:
Adenosin-5'-triphosphat und Creatinphosphat.
In: Methoden der enzymatischen Analyse (ed.: Bergmeyer, H.U.), Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
p. 2163 - 2177 (3. Auflg. 1974)

89. Sugden, M.C., Christie, M.R., Ashcroft, S.J.H.:
Presence and possible role of calcium-dependent regulator (calmodulin) in rat islets of Langerhans.
FEBS Lett. 105, 95 - 100 (1979)

90. Sutherland, E.W., Rall, T.W.:
Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles.
J. Biol. Chem. 232, 1077 - 1091 (1958)

71. Teshima, Y., Kakiuchi, S.:
Mechanism of stimulation of Ca^{++} plus Mg^{++} - dependent phosphodiesterase from rat cerebral cortex by the modulator protein and Ca^{++}.
Biochem. Biophys. Rec. Commun. 56, 489 - 495 (1974)

72. Thompson, W.J., Appleman, M.M.:
Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain.
Biochemistry 10, 311 - 316 (1971)

73. Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.P.:
Manometric and biochemical techniques.
Burgess Publ. Co., Minneapolis, USA
p. 146 (5. ed. 1972)

74. Valverde, I., Vandermeers, A., Anjaneyulu, R., Malaisse, W.J.:
Calmodulin activation of adenylate cyclase in pancreatic islets.
Science 206, 225 - 227 (1979)

75. Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M.C., Rathé, J., Kutzner, R., Delforge, A., Christophe, J.:
A calcium - dependent protein activator of guanosine-3':5'-monophosphate phosphodiesterase in bovine and rat pancreas.
Eur. J. Biochem. 81, 379 - 386 (1977)

76. Van Inwegen, R.G., Pledger, W.J., Strada, S.J., Thompson. W.J.:
Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases with multiple separation techniques.
Arch. Biochem. Biophys. 175, 700 - 709 (1976)

77. Verspohl, E.J.:
Characterization of chemical properties of insulin receptors on rat islets of Langerhans.
N.S. Arch. Pharmacol. Suppl. 311, R 50 (1980)
(Abstract)

78. Verspohl, E.J.:
Inhibition of Glucose-, Arginine (ARG)-, Aminophylline (AM)-, and p-chloromercuribenzoate (p-CMB)-stimulated insulin secretion by exogenous insulin is associated with specific binding of insulin to pancreatic islets.
7th Intern. Congress of Pharmacology, July 16 - 21, 1978 , Paris

79. Verspohl, E.J., Ammon, H.P.T.:
Evidence for the presence of insulin receptors in islets of Langerhans.
J. Clin. Invest. (im Druck 1980)

80. Verspohl, E.J., Händel, M., Ammon, H.P.T.:
Pentosephosphate shunt activity of rat pancreatic islets: Its dependence on glucose concentration.
Endocrinology 105, 1269 - 1274 (1979)

81. Wagner-Teschner, D.:
Einfluß der Glucosekonzentration auf den NADP- und NADPH-Gehalt sowie die glucoseinduzierte Insulinsekretion Langerhansscher Inseln von gefütterten und gehungerten Ratten.
Diplomarbeit Fachbereich Chemie - Biochemie
Tübingen, 1977

82. Wang, J.H.:
Calcium-regulated protein modulator in cyclic nucleotide systems.
in: Cyclic 3',5'-nucleotides: Mechanisms of action.
(eds.: Cramer, H., Schultz, J.)
J. Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto
p. 47 (1977)

83. Weiss, B., Fertel, R., Figlin, R., Uzunov, P.:
Selective alteration of the activity of the multiple forms of adenosine-3':5'-monophosphate phosphodiesterase of rat cerebrum.
Mol. Pharmacol. 10, 615-625 (1974)

84. Weiss, B., Lehne, R., Strada, S.:
Rapid microassay of adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity.
Anal. Biochem. 45, 222-235 (1972)

85. Wells, J.N., Hardman, J.G.:
Cyclic nucleotide phosphodiesterases.
in: Advances in cyclic nucleotide research, Vol. 8
(eds.: Greengard, P., Robison G.A.)
Raven Press New York, p. 119-143 (1977)

86. Willens, S., Dumont, J.E.:
cAMP-protein kinase interaction.
in: Cyclic 3',5'-nucleotides: Mechanisms of action.
(eds.: Cramer, H., Schultz, J.)
J. Wiley & Sons, London, New York, Sydney, Toronto
p. 59 (1977)

87. Zawalich, W.S., Karl, R.C., Ferrendelli, J.A., Matschinsky, F.M.:
Factors governing glucose induced elevation of cyclic 3'5' AMP levels in pancreatic islets.
Diabetologia 11, 231-235 (1975)

Lebenslauf

Am 30. Juli 1950 wurde ich, Hans-Martin Kallenberger, als Sohn des Apothekers Martin Kallenberger und seiner Ehefrau Helga, geb. Stetter, Apothekerin, in Ellwangen (Krs. Aalen) geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule in unserem Wohnort Wasseralfingen, anschließend wechselte ich zum Schubart-Gymnasium Aalen, wo ich im Juni 1969 die Reifeprüfung ablegte.

Nach dem Wehrdienst (von Juli 1969 bis Dezember 1970) begann ich im Januar 1971 meine Ausbildung als Apothekerpraktikant in der Einhorn-Apotheke in Heilbronn und schloß sie im März 1973 mit dem pharmazeutischen Vorexamen ab.

Im Mai 1973 begann ich mit dem Studium der Pharmazie an der Universität Würzburg und legte dort im April 1975 den ersten Teil und im Oktober 1976 den zweiten Teil der Pharmazeutischen Prüfung ab. Die Approbation als Apotheker erhielt ich im Dezember 1976.

Im November 1976 wechselte ich zur Universität Tübingen und begann bei Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon mit der vorliegenden Dissertation, die ich im Mai 1980 abschloß. Während dieser Zeit von November 1976 bis Mai 1980 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut tätig.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren C.H. Brieskorn, P. Nickel, H. Rüdiger (Pharm. Chemie), J. Riehl (Pharm. Technologie), F.C. Czygan, W. Simonis, K.H. Kubeczka (Pharm. Biologie), W. Döll (med. Mikrobiologie), S. Hünig, M. Schmidt (Chemie), H-G. Häfele, V. Dose (Physik), D. Henschler, H.G. Neumann, U. Trendelenburg (Pharmakologie).

Druck: D. Gräbner, 8602 Altendorf - Tel. 09545/8791